

Entwicklung eines plastischen Trägers für die  
Autologe-Chondrozyten-Transplantation: Ein In-vitro-Modell

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Nils Kröger  
geboren am 15.08.1979 in Blankenburg/Harz

## Gutachter

1. Prof. Dr. R.A. Venbrocks, Eisenberg
2. Prof. Dr. W. Lungershausen, Gera
3. Prof. Dr. K.P. Günther, Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.12.2007

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern  
Christiane und Manfred Kröger.

## 1. Abkürzungen

a.d.	Aqua dest
AK	Antikörper
Bp	Basenpaare
cDNA	Copy-DNA
dNTP	2'Deoxy-Nukleotidtriphosphat
ds	Doppelstrang
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EM	Elektronenmikroskopische Aufnahme
EZM	Extrazelluläre Matrix
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
GAG	Gykosaminoglykane
H&E	Hämatoxylin& Eosin
IH	Immunhistologie
kb	Kilobasen
M.	musculus
mRNA	Boten-/ messenger-RNA
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative PCR (Real-Time-PCR)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphat buffered saline)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
ss	Einzelstrang
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline)
Tris	<i>tris</i> -(Hydroxymethyl) aminomethan
x	x-fache Objektivvergrößerung

## Präfixe

k

kilo

m

milli

$\mu$

mikro

n

nano

p

piko

## Einheiten

g

Gramm

h

Stunden

l

Liter

min

Minuten

## **2. Inhaltsverzeichnis**

<b>1. ABKÜRZUNGEN</b>	<b>I</b>
<b>2. INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>3. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>4. EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
4.1 Hyaliner Knorpel – Bedeutung und Funktion innerhalb des Gelenks	4
4.2 Der spontane Heilungsverlauf von Knorpeldefekten	5
4.3 Reparaturverfahren hyaliner Knorpeldefekte	7
4.4 Die Autologe-Chondrozyten-Transplantation (ACT)	8
4.4.1 Die ACT nach Brittberg et al.	9
4.4.2 Die Matrixgekoppelte Autologe-Chondrozyten-Transplantation (MACT)	11
4.5 Voraussetzungen für die Einführung neuer Trägermaterialien	14
4.6 Ein Träger aus resorbierbaren Gelatinepulver– Das Spongostan®	17
4.6 Ziel	19
<b>5. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
5.1 Geräte	20
5.2 Chemikalien	21
5.3 Enzyme	22
5.4 Färbungen	22
5.5 Antikörper	22
5.6 Test Kits	23
5.7 Verbrauchsmaterialien	23
5.8 Computersoftware	24
5.9 Puffer und Lösungen	24
5.10 Methoden	24
5.10.1 Präparation der bovinen Kniegelenke und Gewinnung der Zellkulturbestandteile	24
5.10.2 Präparation von Chondrozyten aus nativem Knorpel	26
5.10.3 Herstellung eines 3D-in-vitro-Kulturmodells	27
5.10.4 Referenzkulturen	29
5.10.5 Zellkulturbedingungen	30

5.10.6 Auswertung	30
5.10.6.1 Histologie	30
5.10.6.1.1 Entnahme der Zellkulturen für die Histologie	30
5.10.6.1.2 Vorbehandlung der Gewebeschnitte	31
5.10.6.1.3 Färbung der Gewebeschnitte	31
5.10.6.1.4 Elektronenmikroskopie	33
5.10.6.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
5.10.6.2.1 RNA-Extraktion	34
5.10.6.2.2 Reverse Transkription	35
5.10.6.2.1 Die RT-PCR	35
5.10.6.2.3 Die Real-Time-PCR	36
<b>6. ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
6.1 Das Verhalten des Spongostanimplantats in der Zellkultur	40
6.1.1 Die Stabilität des Implantats in der Zellkultur	40
6.1.2 Das Verhalten des Implantats gegenüber dem Umgebungsknorpel	41
6.2 Das Verhalten der Chondrozyten in der Zellkultur	42
6.2.1 Die Zellverteilung	42
6.2.2 Strukturelle Feindiagnostik der Chondrozyten im Spongostanimplantat	43
6.2.3 Dedifferenzierungsverhalten der Chondrozyten	45
6.2.3.1 Dedifferenzierungsmarker auf mRNA-Ebene	46
6.2.3.2 Der Transkriptionsfaktor SOX-9	47
6.2.4 Untersuchungen auf inflammatorische Reaktionen der Chondrozyten	48
6.3. Die Entwicklung der Extrazellulären Matrix in der Zellkultur	49
6.3.1 Aggrekan	50
6.3.2 Glykosaminoglykane	52
6.3.3 Kollagen-Typ II	53
6.3.4 Kollagen-Typ VI	55
6.3.5 Kollagen-Typ X	58
6.3.6 Kollagen-Typ I	59
6.3.7 Kollagen-Typ III	61
<b>7. DISKUSSION</b>	<b>63</b>
7.1 Die Problematik von Trägermaterialienstabilität und deren mangelnde Integration in Knorpeldefekte	63
7.2. Chondrozytäre Veränderungen in Kulturmodellen	64

7.3 Die Extrazelluläre Matrix – Säule der biomechanischen Funktionalität des hyalinen Knorpels	69
7.3.1 Glykosaminoglykane und Proteoglykane- Träger von Druckbelastungen	70
7.3.2 Die Kollagene – Träger von Torsions- und Scherkräften	72
<b>8. SCHLUSSFOLGERUNGEN</b>	<b>82</b>
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>85</b>
<b>ANHANG</b>	<b>102</b>



### **3. Zusammenfassung**

Schmerzen und Funktionseinschränkungen von Gelenken sind häufig der Grund für Beschwerden, die Patienten an der Bewältigung ihrer Arbeitsaufgaben hindern. Zum Teil ist der Leidensdruck so stark, dass notwendige Tätigkeiten des Alltags gar nicht mehr verrichtet werden können. Dies bringt eine erhebliche Minderung der Lebensqualität mit sich. Aber nicht nur für die Betroffenen selbst ist dieses Thema von herausragender Relevanz. Auch volkswirtschaftlich und gesundheitspolitisch werden durch hieraus resultierende Fehlzeiten am Arbeitsplatz sowie entstehende Behandlungs- und Rehabilitationskosten hohe finanzielle Belastungen verursacht. Knorpelschäden, die unbehandelt in der Entstehung einer Osteoarthritis münden, stehen dabei häufig im Mittelpunkt des Pathogenese Prozesses. Daher werden schon seit Jahren intensive Bemühungen unternommen, um Verfahren zu entwickeln, die eine frühzeitige Restitution des geschädigten Knorpels ermöglichen sollen. Jüngstes Reparaturverfahren ist die Autologe-Chondrozyten-Transplantation (ACT).

In dieser Arbeit wurde ein 3D-in-vitro-Modell entwickelt, das Untersuchungen eines neuen potentiellen plastischen Trägermaterials (Hämostyptikum Spongostan®) für die Matrixgekoppelte-Autologe-Chondrozyten-Transplantation (MACT) ermöglichte. Die Ergebnisse aus diesem Kulturmodell wurden mit denen aus Monolayerkulturen und aus kultivierten Knorpel-Knochen-Explantaten verglichen. Die Untersuchungen erfolgten unter der Fragestellung, ob das Trägermaterial während des Kultivationszeitraums von drei Wochen die vorgegebene Form der Knorpeldefekte bewahrt. Weiterhin war von Interesse, ob eine Interaktion des Defektknorpels mit dem Spongostanimplantat bereits in-vitro vorkommt. Darüber hinaus stand zur Diskussion, ob in dem Material eine homogene Zellverteilung erzielt wird und es genügend Adhärenz besitzt, um die Chondrozyten in dieser Lage zu halten. Auf zellulärer Ebene wurden das Dedifferenzierungsverhalten, die Vitalität, die Entzündungsreaktionen und das Expressionsverhalten auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Die Auswertung erfolgte mit konventionellen und immunhistologischen Färbemethoden, der Elektronenmikroskopie sowie molekularbiologisch mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

Es konnte gezeigt werden, dass das Material während des Kultivationszeitraums die vorgegebene Form der Defekte beibehält. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen

ergaben: In den Defekträndern war es zu einer partiellen Neuorientierung der Kollagenfasern in Richtung des Implantats gekommen.

Die Zellverteilung war innerhalb des Implantats homogen und blieb in diesem Muster während des gesamten Kultivationszeitraums erhalten. Im Gegensatz hierzu bildeten sich in den superfiziellen Knorpelschichten der Knorpel-Knochen-Explantate Zellcluster. Gleichzeitig kam es zu einer relativen Zellverarmung in den mittleren Schichten. Auch in der Monolayerkultur hatten die Zellen eher die Tendenz, sich in Clustern zu organisieren. Der chondrozytäre Phänotyp blieb über den gesamten Kultivationszeitraum erhalten. Ein hierfür wichtiger Transkriptionsfaktor, das SOX-9, war sowohl als Protein als auch auf mRNA-Ebene nachweisbar.

Weiterhin bildeten die Chondrozyten im elektronenmikroskopischen Bild reichlich Matrixvesikel und aktive Stofftransportprozesse über die Zellmembran waren darstellbar. In nur einem Versuchsansatz waren Il-1 und VEGF als Marker für Entzündungsaktivitäten nachweisbar.

Wesentliche Proteine der EZM wie das Kollagen-Typ II, VI, Aggrekan und auch Glykosaminoglykane waren in dem Spongostan®-in-vitro-Modell darstellbar. Die gleichen Komponenten der EZM konnten in den Explantatkulturen nachgewiesen werden. Dabei fiel hier die intensive Bildung des Kollagens-Typ VI insbesondere in den Bereichen, in denen es zu Clusterbildung gekommen auf. Bei den Monolayerkulturen waren diese Bestandteile, mit Ausnahme der GAGs, ebenfalls nachweisbar. Hierzu muss aber einschränkend festgehalten werden, dass sich der Nachweis ausschließlich auf Bereiche beschränkte, in denen es den Chondrozyten gelungen war, sich in Clustern zu organisieren. Weiterhin konnte Kollagen-Typ X nachgewiesen werden. Während sich der Nachweis in den Explantatkulturen auf die kalzifizierte Zone zwischen hyalinem Knorpel und subchondralem Knochen beschränkte, war in dem Spongostan®-in-vitro-Modell und in der Monolayerkultur der ubiquitäre Kollagen-Typ-X-Nachweis möglich.

Bei der Untersuchung des mRNA-Expressionsniveaus wurde das Expressionsverhalten in frischen unverdauten Knorpel, isolierten Chondrozyten und innerhalb der drei Kulturmodelle untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Knorpelzellisolation zu einer Veränderung der Transkriptionsaktivität führt. Das Verhalten ist dabei sehr unterschiedlich. Während die mRNA des Proteoglykans Aggrekans sowie des Kollagen-Typs III vermehrt gebildet wird, reduziert sich die Transkription der Kollagene-Typ X und I. Kol-

lagen-Typ II wird nahezu unverändert expremiert. Eine Transkription der Gene des Kollagen-Typs VI findet genau wie bei frischem unverdaulichem Knorpel nicht statt.

Während der Kultivation war bezüglich der Aggrekan- und der Kollagen-Typ-II-mRNA-Expression, im Vergleich zu unkultiviertem Knorpel und frisch isolierten Chondrozyten, in allen Kulturmodellen ein herabgesetztes mRNA-Expressionsverhalten zu beobachten. Dies gilt auch für das Spongostan®-in-vitro-Modell und die Monolayerkultur bei der mRNA-Expression des Kollagen-Typs X, jedoch nicht für die Explantatkultur. Die mRNA des Kollagen-Typs VI war nur im Spongostan®-in-vitro-Modell und in der Explantatkultur nachweisbar. Kollagen-Typ-I-mRNA wurde nach der Isolation in weit geringerem Umfang expremiert. Im Spongostan®-in-vitro-Modell blieb dieses in ähnlicher Höhe wie bei den isolierten Chondrozyten erhalten. In der Monolayerkultur sowie in den Explantatkulturen war das Expressionsniveau bezüglich des Kollagen-Typs I mit frischem Knorpel vergleichbar. Kollagen-Typ-III-mRNA wird nach der Isolation vermehrt und dann in den Kultursystemen auf einem niedrigerem, dem frischem Knorpel vergleichbaren, Niveau gebildet.

Zusammenfassend ist festzuhalten: Die Transkription ist bezüglich aller in dieser Arbeit untersuchter Parameter im Spongostan®-in-vitro-Modell am niedrigsten. Schon vielfach wurde beschrieben, dass Chondrozyten einen sehr niedrigen Stoff- und Strukturstoffwechsel besitzen. Aus Kultursystemen ist bekannt, dass der typisch chondroide Phänotyp mit einer herabgesetzten Proliferationstätigkeit einhergeht. Da die Chondrozyten innerhalb des Spongostans ihren Phänotyp hervorragend stabilisieren können, ist somit auch das vergleichsweise niedrige Transkriptionsniveau erklärbar.

Bei hyalinem Knorpel handelt es sich um ein sehr sensibles, vom Umgebungsmilieu abhängiges Gewebe. Das hohe Maß an Variabilität der Ergebnisse hebt dies hervor. Hieraus wird deutlich, wie schwierig sich In-vitro-Untersuchungen an Chondrozyten gestalten. Wie kaum eine andere Zelle reagiert der Chondrozyt sehr sensibel auf Veränderungen seiner Umgebung. Das in dieser Arbeit entwickelte Kulturmodell erwies sich trotzdem für erste Untersuchungen des potenziellen Trägermaterials Spongostan® als geeignet. Der Nachweis wichtiger Einzelkomponenten der EZM und deren mRNA sowie die erhaltene Morphologie der Chondrozyten beweisen dies.

Ob Spongostan® letztlich wirklich das Potenzial besitzt, als ein Trägermaterial in der MACT eingesetzt zu werden, muss in weiter verbesserten In-vitro-Techniken und nicht zuletzt auch in In-vivo-Untersuchungen abschließend geklärt werden.

## 4. Einleitung

### 4.1 Hyaliner Knorpel – Bedeutung und Funktion innerhalb des Gelenks

Für die Funktion eines Gelenkes hat der hyaline Knorpel eine wesentliche Bedeutung. Er ist durch seinen einzigartigen Aufbau in der Lage, ein Vielfaches der Belastung des Körpergewichts zu tolerieren (Muir H 1995). Sein ausgesprochen niedriger Reibungskoeffizient und seine Kompressionsfähigkeit reduzieren die auf ein Gelenk einwirkenden Spitzenbelastungen des subchondralen Knochens erheblich (Mollenhauer J 2003).

Maßgeblich daran beteiligt ist die Zusammensetzung der EZM des Knorpels. Ihr Gehalt an Kollagen-Typ II (Ulrich-Vinther M 2003, Eyre DR 2006), Glykoproteinen und Proteoglykanen führt die herausragenden Eigenschaften dieses Gewebes herbei. Die hochmolekularen Proteoglykane weisen ein exzessiv hohes Wasserbindungsvermögen auf. Dies und die Einbettung der Proteoglykane in das Kollagennetzwerk begründen die Kompressionsfestigkeit des hyalinen Knorpels (Ulrich-Vinther M 2003). Dadurch entsteht ein hoher Schwellendruck, der eine ständige Tendenz zur Wasseraufnahme des Knorpels auslöst. Dem wirkt das Kollagennetzwerk entgegen. Aus diesem Grund sind Proteoglykane physiologisch nur zu 40 % hydratisiert (Mollenhauer J 1997). Die dadurch verursachte Vorspannung des Gewebes ist in der Lage, im Belastungsfall die Höhenminderung des Knorpels erheblich zu reduzieren. Bei jeder Be- und Entlastung wirkt ein Pumpmechanismus, durch den Wasser in den Knorpel einströmt.

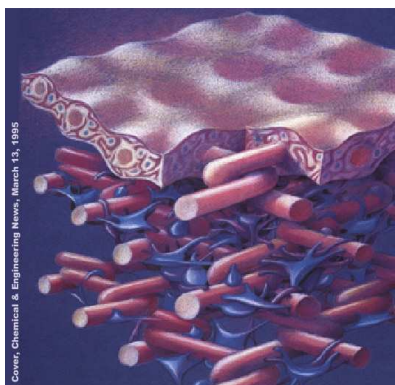


Abb 1 Schematischer Aufbau des hyalinen Knorpels. Quelle: Cover, Chemical& Engineering News, March 13, 1995

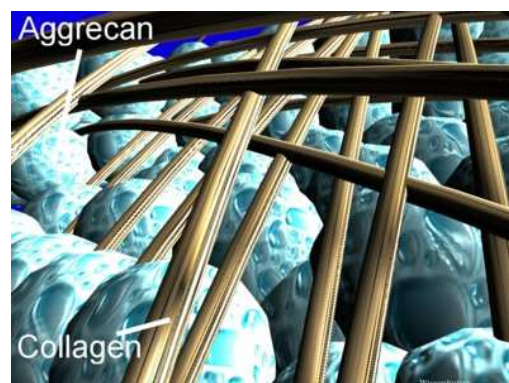


Abb 2 Schematischer Aufbau der Extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpels. In das Netz der Kollagene sind die Proteoglykane eingelagert, deren wichtigster Vertreter das Aggrecan ist. Quelle: <http://www.cdaarthritits.com>

Dieser Vorgang bedingt die Ver- und Entsorgung der Chondrozyten (Mollenhauer J 2003).

Insgesamt stellt der hyaline Knorpel ein sehr sensibles System dar, das für kleinste Störungen anfällig ist. Schon geringste Schädigungen in der EZM führen zum Verlust der biomechanischen Eigenschaften.

#### 4.2 Der spontane Heilungsverlauf von Knorpeldefekten

Bereits Hunter (1743) beschrieb, dass hyaliner Knorpel ein eingeschränktes Heilungsvermögen besitzt. Die wesentlichen Ursachen hierfür liegen in seiner Struktur und Anatomie begründet (Buckwalter JA 1999). Die Heilungswahrscheinlichkeit hängt jedoch stark vom Alter des Patienten ab (Martin JA 1996, Martin JA 2001).

Da hyaliner Knorpel keinen Zugang zu speziellen Vorläuferzellen besitzt, verbleiben nach einer Verletzung Immigrations- und Vermehrungsschritte spezialisierter Vorläuferzellen. Daher entfällt bei einer nur oberflächlichen Schädigung des Knorpels eine Defektfüllung (Müller W 1999).

Führt eine Schädigung auch zur Eröffnung des subchondralen Knochens, können Zellen des Markraums in den Defekt immigrieren. In der Defektzone bilden diese ein fibröses Narbengewebe. Durch seine strukturelle Beschaffenheit kann das Ersatzgewebe den biomechanischen Anforderungen eines Gelenks nicht standhalten (Grifka J 2000, Akeson WH 2001, Martinek V 2001, Ochi M 2001, Buckwalter JA 2002). Schon nach wenigen Jahren wird es deshalb wieder zerstört (Wirth CJ 1996).

Knorpeldefekte provozieren bei ausbleibender Intervention die Entstehung einer Arthrose. Der Zusammenhang zwischen Kniebinnenverletzung mit Knorpelschaden und der späteren signifikanten Entwicklung einer Arthrose ist von vielen Autoren beschrieben worden (Chen FS 1999b, Jensen CH 1999, Lau EC 2000, Hunter DJ 2002, Triantofillipopoulos IK 2002).

Gelber et al. (2000) belegten in einer prospektiven randomisierten Studie, dass Kniebinnenverletzungen in jungen Jahren das Arthroserisiko um den Faktor 2,95 und im Erwachsenenalter um den Faktor 5,17 erhöhen. In einer anderen Studie wiesen Messner et al. (1996) nach, dass Knieverletzungen mit Knorpeldefekten und spontanem Heilungsverlauf

bei jungen Sportlern in 40 Prozent aller untersuchten Fälle innerhalb von 14 Jahren Zeichen der Arthroseentstehung aufwiesen.

Nicht traumatisch bedingte Knorpelschäden veranlassen gleichfalls die Herausbildung einer Arthrose. Deutliche Unterschiede zeigen sich hierbei zwischen Patienten, deren Wachstumsfuge bereits geschlossen und jenen, deren Wachstumsfuge noch geöffnet ist. Prakash et al. (2002) veröffentlichten eine Studie zur frühzeitigen Entstehung einer Arthrose im Zusammenhang mit einer Osteochondrosis dissecans bei bereits geschlossenen Wachstumsfugen. Sie ermittelten, dass die überwiegende Zahl dieser Patienten bei spontanem Heilungsverlauf eine Arthrose entwickelt. Anders verhielt es sich bei Patienten mit geöffneter Wachstumsfuge. Hier fiel die Zahl der Betroffenen, die im weiteren Verlauf eine Arthrose entwickelten, deutlich geringer aus (Twayman RS 1991, Prakash D 2002).

Die Pathophysiologie des Arthroseprozesses, der den Endpunkt im spontanen Heilungsverlauf von Knorpelschäden darstellt, ist noch nicht abschließend geklärt. Gegenwärtig wird in der Wissenschaft davon ausgegangen, dass die reduzierte Kontaktfläche infolge der Knorpelschädigung den verbliebenen Knorpel überlastet (Behrens P 2002). Wird das Knorpelrudiment permanent überlastet, führt das zu einer Veränderung der Stoffwechsellage der Chondrozyten. Diese Modifikationen setzen wiederum antianabol, katabol und apoptotisch wirkenden Botenstoffe, wie beispielsweise IL-1 oder TNF- $\alpha$ , frei.

Zusätzlich produzieren Chondrozyten das Kollagenetzwerk zerstörende Proteasen. Defekte Kollagenetzwerke sind unfähig, Proteoglykane einzulagern. Somit geht das Wasserbindungsvermögen verloren. Weniger im Knorpel gebundenes Wasser ruft eine Höhenminderung des Knorpels hervor. Veränderte Eigenschaften der Knorpeloberfläche und der Verlust des Wasserbindungsvermögens verändern die Tribologie des Gelenkspalts weitgehend.

Durch apoptotische Chondrozyten und Kollagenfragmente wird der Pathogeneseprozess aufrechterhalten und zusätzlich stimuliert (Jennings L 2001). Die Destruktion schreitet bis zur subchondralen Knochenplatte fort. Als finales Stadium gilt die Osteoarthrose.

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich schlussfolgern: Knorpeldefekte sollten nicht dem spontanen Heilungsverlauf überlassen werden. Sie bedürfen einer frühzeitigen Intervention.

### 4.3 Reparaturverfahren hyaliner Knorpeldefekte

Im Jahre 1995 wurden in den USA 680.000 Kniearthroskopien durchgeführt. Bei 427.800 aller Patienten wurden Knorpelschäden diagnostiziert. Die Versorgung der Patienten mit der Mikrofrakturierung oder osteochondralen Autografts verursachte Kosten in einer Höhe von 300 Millionen bis zu einer Milliarde US-Dollar (Brittberg M 2001).

Dieses Kostenbeispiel veranschaulicht die Motivation vieler Wissenschaftlicher, Reparaturmethoden zur Restitution von beschädigtem Knorpel zu entwickeln. Knorpeldefekte und die Folgeerkrankung Osteoarthritis, verursachen Schmerzen und schränken die Funktion des Gelenkes ein. Im Gegensatz dazu, verbessert eine erfolgreiche Knorpelreparatur die Lebensqualität der Betroffenen deutlich (Minas T 1998, Peterson L 2000).

Mittlerweile existiert eine Vielzahl von Verfahren, die das Ziel der Knorpelheilung verfolgen. Relativ einfache Methoden wie die Knorpelglättung und die Gelenkspülung haben sich als wirkungslos herausgestellt. Moseley et al. (2002) berichten von enttäuschenden Resultaten dieser beiden Verfahrenstechniken in einer prospektiven, randomisierten und placebokontrollierten Studie. Die rein symptomatischen Verfahren sind folglich nicht fähig, die Lebensqualität des Patienten dauerhaft zu verbessern.

Bei der Periost- oder Perichondriumtransplantation werden Transplantatlappen in den Knorpeldefekt eingebracht. Laut wissenschaftlicher Annahme soll sich aus den Vorläuferzellen dieser Gewebe neues Knorpelgewebe bilden. Studien belegen jedoch, dass mit diesen Verfahren bereits mittelfristig schlechte Ergebnisse erzielt werden (Angermann P 1998, Madsen BL 2000). Die vorzeitige Verkalkung des Implantats gilt als eines der Hauptprobleme (Minas T 1997).

Die Transplantation von Knorpel-Knochen-Explantaten erfolgt durch Entnahme der Explantate von den posterioren Femurkondylen des Patienten oder durch ein allogenes Transplantat. Die Transplantation von allogenen Knorpel-Knochen-Explantaten sollte jedoch auf Einzelfälle beschränkt bleiben. Berücksichtigt werden sollten nur jene, bei denen auf Grund knöcherner Defekttiefe alternative Verfahren ausgeschlossen sind. Die Gefahr der Abstoßung und Infektion ist hier besonders hoch (Gross AE 2002). Im weiterentwickelten Verfahren, dem Mega-OATS, entfällt neben der Materialentfernung auch die Gefahr der Transplantatschädigung. Hierbei werden mittel- bis langfristig gute Ergebnisse berichtet (Meyers MH 1989, Bugbee WD 1999, Jakob RP 2002, Hangody L 2003, Hangody L 2004). Auf Grund der begrenzten Spenderfläche, der Komorbidität und der

mangelhaften Oberflächenkongruenz ist die Anwendung jedoch nur begrenzt durchführbar (Behrens P 2002). Die Anwendbarkeit ist auf eine maximale Ausdehnung von vier Quadratzentimetern begrenzt (Hangody L 2004).

Bei knochenmarkstimulierenden Techniken, wie Pridiebohrung (Pridie KW 1959) und Mikrofrakturierung, wird durch penetrierende Maßnahmen arthroskopisch ein Zugang vom Knorpeldefekt aus zum subchondralen Markraum geschaffen. Dies induziert die Bildung von fibrösem Narbengewebe, was den biomechanischen Anforderungen eines Gelenks jedoch nicht standhält (Martinek V 2001, Hunziker EB 2002). Möglich sind positive Ergebnisse nur bei kleineren Knorpeldefekten. Dies konnte in einer Studie von Steadmann (2003) belegt werden. Hier betrug die durchschnittliche Defektgröße lediglich  $2,77 \text{ cm}^2$  (Steadmann JR 2003). Sämtliche Langzeitergebnisse sind hingegen überwiegend enttäuschend (Bouwmeester PS 2002).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass keines der hier vorgestellten Verfahren befähigt ist, ein Gewebe dauerhaft zu induzieren, damit es den speziellen Anforderungen an die Funktionalität und Biomechanik des Gelenks gerecht wird (Chen FS 1999a, Brittberg M 2001).

#### 4.4 Die Autologe-Chondrozyten-Transplantation (ACT)

Als jüngstes Verfahren zur Knorpelreparatur gilt die Autologe-Chondrozyten-Transplantation (ACT). Damit ist die Transplantation von patienteneigenen Chondrozyten in einen Knorpeldefekt gemeint.

Hierfür werden Chondrozyten aus einer Stelle des Gelenks, die für die Biomechanik nicht entscheidend ist, arthroskopisch entnommen (Brittberg M 1994). Die mediale und laterale femoropatellare Gleitbahn sowie der Notchbereich sind dafür besonders geeignet. Danach wird das Präparat in eine sterile Nährlösung aufgenommen. Mit Hilfe von Proteasen und Kollagenasen werden die Chondrozyten isoliert, indem der Knorpel verdaut wird (Behrens P 2002).

Die weitere Behandlung der Zellen ist davon abhängig, wie die Transplantation durchgeführt wird. Zwei Methoden sind hierfür bisher beschrieben worden.

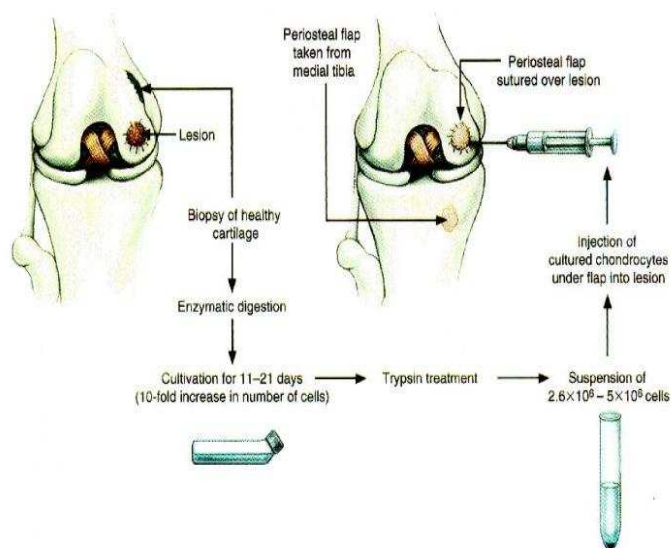


#### 4.4.1 Die ACT nach Brittberg et al.

Brittberg et al. (1994) haben ein Verfahren zur ACT vorgestellt, das sich bis heute vielfach bewährt hat.

Nach der oben beschriebenen Entnahme des Knorpels mit anschließender Zellisolation werden die Zellen über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen in Monolayerkulturen expandiert. Bevor die Zellen in die Kultur aufgenommen werden, wird eine Eingangskontrolle durchgeführt, bei der knorpelspezifische mRNA nachgewiesen wird (z.B. Kollagen-Typ II). Zudem werden die Zellen auf Entzündungsparameter (z.B. IL-1) untersucht (Behrens P 2002). Nach der Expansion der Zellzahl wird in einer Ausgangskontrolle deren Vitalität und das Vorhandensein von knorpelspezifischer mRNA überprüft (Behrens P 2002).

Die Transplantation erfordert die Arthrotomie des Gelenks. Zunächst wird der Knorpeldefekt durch eine Begradigung der Defektränder präpariert. Im Bereich der Defektlokalisation muss eine ausreichend hohe Knorpelschulter vorhanden sein, da über den Defekt ein Periostlappen genäht wird. Entnommen wird dieser aus dem Bereich der proximalen Tibia.



Brittberg M, Petersen L, et al.: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 331: 889-895 (1994)

Abb 3 Schematische Darstellung der ACT nach Brittberg et al. (1994)

FM 16 w: flake fracture retropatellar

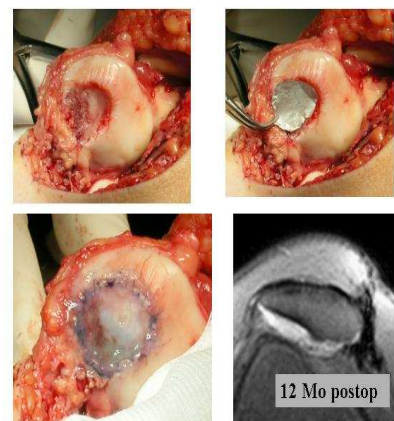


Abb 4 Beispiel für die Durchführung mittels Arthrotomie nach Brittberg et al.:

- 1+2 Präparation des Knorpeldefekts
3. Aufgenähter Periostlappen
4. Läsion 12 Monate postoperativ

Zusätzlich werden die Ränder des Periostlappens mit Fibrinkleber abgedichtet. Nach der Vorstellung von Brittberg et al. entsteht so eine abgeschlossene Brutkammer, in welche die Chondrozyten in einer Zellsuspension appliziert werden.

Die Durchführung der ACT nach dem Brittberg-Schema induziert im behandelten Defektareal des Gelenkes die Entstehung eines hyalinen bzw. hyalinähnlichen Knorpelregenerats (Buckwalter JA 1998a, Peterson L 2000, Peterson L 2002).

Nach wissenschaftlichen Annahmen ähnelt der Neoknorpel in seinen Eigenschaften einem nativen Knorpel weitestgehend. In seiner Biomechanik ist dieser mit einem Faserknorpel nicht vergleichbar (Minas T 1997, Peterson L 2002). Einigen Autoren konnten darüber hinaus nachweisen, dass dieses Verfahren hinsichtlich eines besseren Outcomes gegenüber der Mikrofrakturierung (Minas T 1997), der Periostlappentechnik (Angermann P 1998) und der Mosaikplastik (Bentley G 2003) überlegen ist.

Trotz der genannten positiven Ergebnisse, weist das Verfahren Schwächen auf. Von der „AG für ACT und Tissue Engineering“ unter der Schirmherrschaft der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) und der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC) (Behrens P 2002) werden die folgenden Risiken angeführt:

Für die Durchführung der Transplantation bedarf es einer langstreckigen Arthrotomie. Im Vergleich zu einem arthroskopischen Eingriff sind die Patienten postoperativ schwerer zu mobilisieren. Es besteht eine vergleichsweise hohe Infektionsgefahr, das Risiko eines Gelenkergusses steigt. Der Zeitraum des Aufnähens des Periostlappens ist so lang, dass der noch gesunde Gelenkknorpel auszutrocknen droht. Da Wasser, wie oben beschrieben, für die Vitalität eines gesunden Knorpels essentiell ist, könnte dieser damit geschädigt werden. Im Übrigen kann der aufgenähte Periostlappen hypertrophieren und damit die Hypertrophie des gesamten Transplantats auslösen. Das Aufnähen des Periostlappens erfordert häufig eine chirurgische Präparation des Knorpeldefekts

Zahlreiche Autoren beschreiben, dass eine iatrogene Schädigung den Zellverlust im Bereich des Defektrandes verursacht (Mitchel N 1987, Shapiro F 1993, Tew S 2000, Hunziker EB 2003). Die gleichen Ergebnisse sind auch in In-vitro darstellbar (Abb.5).

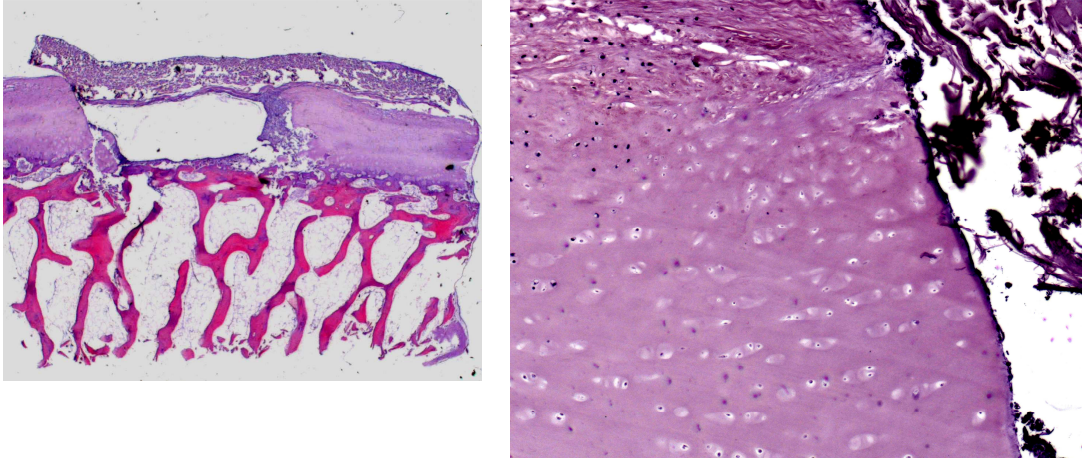


Abb 5 Verlust der basophilen Anfärbbarkeit der Zellkerne im Bereich des Defektrandes (rechts) im Vergleich zu Arealen (links), die weiter entfernt liegen, aus einem Versuchsansatz, in dessen Knorpeldefekt eines Knorpel-Knochen-Explantats eine Zellsuspension eingebracht und die Oberseite mit einer Kollagenmembran überdeckt wurde. Diese Tatsache zeugt vom Zelltot in den Defekträndern und könnte eine Erklärung für das mangelhafte Einwachsverhalten von Implantaten sein. Versuchsansatz der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Links Übersichtsbild HE 1,25x, Rechts Fotografie des Defektrandes HE 10x

Damit ist erkennbar, dass durch eine iatrogene Schädigung einem bereits geschädigten Knorpel in den Defekträndern Zellverlust droht, welcher das Einwachsen des neu gebildeten Knorpels in die Defektränder erschwert.

Somit wird deutlich, dass die ACT nach Brittberg et al. zwar sehr viele Vorteile bei der Behandlung von Knorpeldefekten bietet, aber auch Probleme mit sich bringt, die bisher noch nicht zufrieden stellend gelöst werden konnten.

#### 4.4.2 Die Matrixgekoppelte Autologe-Chondrozyten-Transplantation (MACT)

Neben dem Verfahren nach Brittberg et al. (1994) ist es außerdem möglich, Chondrozyten in einem Trägermaterial zu transplantieren. Die verwendeten Materialien können sowohl natürlicher oder synthetischer Herkunft sein.

Subsumiert wird diese Vorgehensweise unter den Begriff „Tissue Engineering“. Erstmals beschrieben wurde das Verfahren durch Cima et al. (1991). Genauer handelt es sich um die Herstellung eines Implantates in-vitro, das anschließend in den Knorpeldefekt transplantiert wird. Aus wissenschaftlicher Sicht bildet das Implantat ein Konstrukt aus lebenden Zellen und einer passiven avitalen Matrix. Durch das „Tissue Engineering“ könnten

die oben beschriebenen Nachteile der Arthrotomie vermieden werden. Arthroskopische Eingriffe wären so denkbar.

Während beim Brittberg-Schema noch keine typische zonale Strukturierung des Neoknorpels nachgewiesen werden konnte, ist diese Herausforderung möglicherweise mit der MACT beantwortbar. Eingriffe, die bisher wegen einer fehlenden periläsionalen Knorpelschulter nicht möglich waren, könnten mit der MACT erfolgreich durchgeführt werden. Eine chirurgische Präparation mit der damit verbundenen iatrogenen Schädigung würde entfallen. Selbst Eingriffe von bereits osteoarthrotisch veränderten Gelenken wären so in Zukunft denkbar. Obwohl das „Tissue Engineering“ vor allem im Bereich der Knorpelzelltransplantation, enorme Möglichkeiten bietet, bleiben noch eine Vielzahl offener Fragen.

Ein wesentliches Problem stellt dabei die Beschaffenheit des Trägermaterials dar, welches die hoch komplexen Funktionen der EZM nur eingeschränkt übernehmen kann. Neben ihrer mechanischen Funktion hat die EZM im hyalinen Knorpel noch viele weitere Aufgaben. Zusätzlich ist sie in der Lage, das Differenzierungsverhalten der Chondrozyten zu beeinflussen. Durch spezielle Matrixmoleküle und Bindungen zwischen Kollagenen und Integrinen kann die Genexpression über Signalkaskaden verändert werden. Darüber hinaus ist die EZM ein wichtiges Reservoir für Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Gaissmaier C 2003). An den Einsatz von Trägermaterialien sind folglich höchste Anforderungen zu stellen, da diese bis zur Restitution des Knorpels vorübergehend die Funktion der EZM übernehmen müssen (Gaissmaier C 2003). Deshalb werden nur wenige der bisher getesteten Trägermaterialien im klinischen Alltag verwendet.

Kollagene besitzen innerhalb aller Säugetierspezies eine hohe Identität. Durch Verwendung von kollagenen Trägermaterialien ist so auch der Einsatz von Materialien xenogenen Ursprungs möglich. Hinzu kommt, dass die Abbauprodukte der Kollagene physiologisch sind und nicht toxisch wirken (Hunziker EB 2002).

In der klinischen Anwendung befinden sich Kollagene in Form von Membranen, Vliesen und Gelen. Vliese und Membranen haben den Nachteil, dass eine homogene Zellverteilung innerhalb des Materials nicht möglich ist (Gaissmaier C 2003). In den Kollagengelen dagegen besteht die Möglichkeit, dieses Zellverteilungsmuster zu erzielen. Für den chirurgischen Einsatz mangelt es ihnen aber an der nötigen Stabilität. Außerdem kann es zu Schrumpfungsprozessen kommen, die eine Integration des Neoknorpels in die Umgebung verhindern (Abb.6).

Die mangelnde Stabilität ist auch eine Ursache, die gegen einen möglichen Einsatz von Hyaluronsäure spricht. Sie müsste als mögliches Trägermaterial mit Alkoholen querverestert werden (Goa KL 1994). Dadurch gehen aber die hohe Biokompatibilität (Barbucci R 2000) und die antiphlogistische Wirkung des Materials verloren.

Auch Fibrin ist als Träger zu instabil

(Itay S 1987). Zudem werden von einigen Autoren die Zytotoxizität und die hemmende Wirkung auf die Knorpelbildung des Fibrins diskutiert (Homminga GN 1993).

Obwohl sie in-vitro hervorragende Ergebnisse erzielen, sind die Trägermaterialien Alginate und Agarose infolge ihrer Immun- und Fremdkörperreaktionen (Diduch D 2000, Frangonas E 2000) ebenfalls für den klinischen Gebrauch ungeeignet. Sie sind aber in der Lage, den chondroiden Phänotyp zu bewahren und dedifferenzierte Chondrozyten größtenteils wieder zu redifferenzieren (Hauselmann HJ 1994, Hunziker EB 2002). Chitosan, das aus Chitin gewonnen wird, ist einer der weltweit am häufigsten vorkommenden Polymere. In In-vitro-Untersuchungen konnte belegt werden, dass diese sich günstig auf den Stoffwechsel von Osteoblasten und Chondrozyten auswirken. Weitergehende In-vivo-Untersuchungen liegen derzeit noch nicht vor (Gaissmaier C 2003).

Außer möglichen natürlichen Trägermaterialien sind noch eine Reihe weiterer Stoffe synthetischer Herkunft für den Einsatz in der MACT denkbar. An synthetischen Trägermaterialien ist u.a. vorteilhaft, dass diese im Gegensatz zu natürlichen Stoffen zumeist unbegrenzt verfügbar sind. Daneben existieren noch weitere Vorteile, die bei den einzelnen Materialien unterschiedlich sind.

Die am häufigsten verwendeten Materialien basieren auf der Milch- und Glykolsäure. Deren Primärstabilität ist zumeist besser als bei Materialien natürlicher Herkunft. Variieren lässt sich diese durch die entsprechende Wahl der Quervernetzungen, die Faserstärke und die Faserverknüpfung. Darüber hinaus ist es möglich, die poröse Struktur genau einzustellen, damit eine optimale Versorgung der Chondrozyten innerhalb des Materials gewährleistet ist.

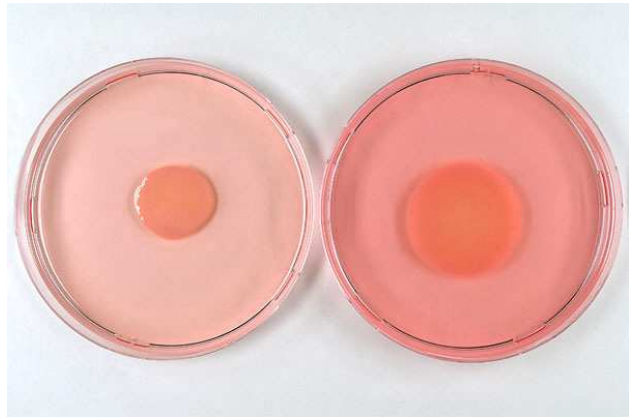


Abb 6 Schrumpfung eines Kollagengels in der Zellkultur, während eines Zeitraums von 3 Wochen.

Da beim Abbau der Milch- und Glykolsäure der lokale pH-Wert reduziert wird, ist ihr Einsatz nach derzeitigem Kenntnisstand nicht in Betracht zu ziehen (Gaissmaier C 2003). Außerdem wurden Versuche mit keramischen Trägermaterialien wie Hydroxylapatit oder Trikalziumphosphat durchgeführt. Beim Abbau der Materialien kam es jedoch zur Freisetzung physiologisch nicht vorkommender Calcium- und Phosphatkonzentrationen. Dies kann die Hypertrophie und Apoptose von Chondrozyten zur Folge haben. Infolge der hohen Empfindlichkeit der Chondrozyten ist der Einsatz von keramischen Trägermaterialien wahrscheinlich ausgeschlossen.

Dies ist nur ein kleiner Ausschnitt einer Reihe von Materialien, die derzeit in der Erprobung sind oder bereits getestet wurden. Es werden des Weiteren Versuche unternommen, das Wachstumsverhalten innerhalb der Trägermaterialien durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren positiv zu beeinflussen. Andere Untersuchungen beschäftigen sich mit mechanischen Stimulationsfaktoren, die Einfluss auf die Vorkultivation von Implantaten nehmen.

Zusammenfassend muss jedoch festgehalten werden, dass keines der bisher bekannten matrixgestützten Transplantationsverfahren mittel- und langfristig zufrieden stellende Ergebnisse erzielt hat (Chen FS 1999a, Nehrer S 1999, Brittberg M 2001). Im Vordergrund stand hierbei v.a. eine mangelnde biologische Verträglichkeit, eine ausbleibende Integration des Implantats in den Knorpeldefekt sowie die ungenügende Stabilität des Trägermaterials.

Auch die Autologe-Chondrozyten-Transplantation nach dem Brittberg-Schema kann nicht alle Probleme lösen, welche durch die Defektheilung von Knorpelschäden ausgelöst werden. Umso wichtiger ist es daher, bestehende Techniken zu verbessern und zusätzlich neue Materialien einzuführen. Diese Arbeit soll einen ersten Teilschritt für die Untersuchung eines neuen plastischen Trägers liefern.

#### 4.5 Voraussetzungen für die Einführung neuer Trägermaterialien

Neue Trägermaterialien erfüllen ihre Aufgabe, die Reparatur eines Knorpeldefekts zu induzieren, auf ganz unterschiedliche Weise. Lu et al. (2001) stellten in einer Arbeit über „Tissue Engineering“ des hyalinen Knorpels Hypothesen über die Art und Weise des Einsatzes neuer Trägermaterialien auf. So sei zum Beispiel der Einsatz eines mit Botenstoffen versehenen Materials denkbar, der die Migration von Zellen in den Defekt bewirkt und so

dessen Heilung herbeiführt. Zum anderen kann das Material im klassischen Sinne des „Tissue Engineerings“ vollzogen werden. Vor ihrem Einsatz würden die Materialien in-vitro mit Zellen besiedelt werden. Danach kann die Transplantation des Implantats erfolgen. Dies ist nach einer Vorkultivation des Implantats oder unmittelbar nach der Besiedlung in-vitro möglich. Einige Autoren berichten darüber hinaus, dass eine Vorkultivation für den Erfolg der Transplantation vorteilhaft ist (Freed LE 1995, Grande DA 1999). Zusätzlich können den Materialien Wachstums- und Differenzierungsfaktoren beigegeben werden, die den Transplantationserfolg positiv beeinflussen können (Gründer T 2004).

In der Literatur benennen viele Autoren eindeutige Vorgaben zur strukturellen Beschaffenheit, den Resorptionseigenschaften und der biomechanischen Funktionalität des idealen Trägermaterials (Boyan BD 1996, Nehrer S 1997, Sittinger M 1999, Coutts RD 2001, Lu 2001, Gaissmaier C 2003, Kuo CK 2006). So muss das Material formbar sein, damit eine einfache chirurgische Handhabung möglich ist. Die Möglichkeit eines arthroskopischen Einsatzes sollte gegeben sein und eine weitergehende iatrogene Schädigung durch chirurgische Präparation vermieden werden. Die Konsistenz des Materials sollte im Idealfall so beschaffen sein, dass sie sich wie eine plastiline Masse in den Defekt einpasst. Darüber hinaus sollte das Material die Fähigkeit besitzen, Chondrozyten im Defekt zu halten. Ein hohes Maß an Adhärenz, die auf die Zellen ausgeübt wird, ist dafür notwendig. Seine Struktur sollte so beschaffen sein, dass durch minimale Diffusionsbarrieren im Inneren des Implantats eine optimale Ver- und Entsorgung der Zellen gewährleistet wird. Die Resorption des Trägers sollte möglichst mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgen, wie der Aufbau des neuen Knorpelgewebes vollzogen wird. Hat sich das neue Gewebe noch nicht vollends aufgebaut, muss das Material dem physiologischen Belastungsstress widerstehen und den Zellen Schutz gewähren. Andererseits muss aber auch soviel Druck auf die Zellen zugelassen werden, wie für die Aufrechterhaltung des Zytoskeletts und damit des chondroiden Habitus notwendig ist (Pauwels F 1960). Der beibehaltene chondroide Phänotyp ist die Grundvoraussetzung für die speziellen chondroiden Funktionen (Rodriguez AM 1998). Zudem muss der Abbau bioverträglich erfolgen. Toxische oder allergische Reaktionen sollten wie auch pH-Wert-Verschiebungen ausgeschlossen sein. Zell-Zell sowie Zell-Matrix-Kontakte müssen für die Zellen gewährleistet sein. Nur so können Signaltransduktionsprozesse gesteuert werden, die für den Aufbau eines neuen Gewebes von entscheidender Bedeutung sind. Hinzu kommt, dass das Material, wie oben

bereits beschrieben, vorübergehend die Funktion der EZM mit vielen der daraus resultierenden Schwierigkeiten übernehmen muss.

Das Konglomerat von Anforderungen, die an ein Trägermaterial gestellt werden, können die bisher existierenden potenziellen Trägermaterialien nur teilweise erfüllen. Es ist zudem fraglich, ob jemals ein Material existieren wird, das allen diesen Voraussetzungen gerecht wird.

Sämtliche neu untersuchten Materialien sollten diesem Ideal aber zumindest nahe kommen. Die AG-ACT und Tissue Engineering unter der Schirmherrschaft der DGU und DGOOC hat in ihren Leitlinien und Empfehlungen zur ACT (Behrens P 2002) folgende Empfehlungen herausgegeben:

- In-vitro-Untersuchungen, die das Wachstums- und Differenzierungsverhalten untersuchen.
- Untersuchungen im Tiermodell (an skelettreifen Tieren) zum Wachstums- und Differenzierungsverhalten, des Langzeitverhaltens (mind. sechs Monate), der immunologischen Reaktion des Tieres und die anschließende histologische Evaluation.
- Pilotstudie am Menschen, was die Verwendung möglichst wenig invasiver Verfahren, die Untersuchung der immunologischen Reaktion und möglichst kontrollierte prospektive Vergleichsstudien umfasst.
- Konfirmatorische Studien mit langfristiger Erfolgskontrolle und Kontakt zum Patienten.



#### 4.6 Ein Träger aus resorbierbaren Gelatinepulver– Das Spongostan®

Spongostan®-Pulver der Firma Johnson& Johnson ist ein Hämostyptikum, das sich seit Jahrzehnten in der Chirurgie bewährt hat. Vor allem in den chirurgischen Teilbereichen Neurochirurgie, Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie, Unfallchirurgie oder auch in der chirurgischen Orthopädie wird das blutstillende Material angewandt. Aus chemischen Gesichtspunkten handelt es sich um ein pH-Wert-neutrales resorbierbares Gelatinepulver. Gewonnen wird diese Gelatine durch die Quervernetzung von Kollagenen zu einer Schwammstruktur. Spongostan® wird aus porcinen Kollagenen hergestellt.

Goodstone et al. (2002) beschrieben erstmals Untersuchungen zum Verhalten von Chondrozyten in Spongostan® unter dem Einfluss von Hyaluronsäure in-vitro.

Laut ihrer damaligen Forschungsergebnisse besitzt Spongostan® das Potenzial, ein Träger im Rahmen der MACT zu sein. Die Kulturbedingungen waren so gewählt, dass die Chondrozyten ausschließlich in Spongostan® eingebettet waren. Im Mittelpunkt der Untersuchung stand der Einfluss der Hyalouronsäure auf das Expressions- und Wachstumsverhalten von Chondrozyten in Spongostan®. Ob Spongostan® als Trägermaterial tatsächlich in Frage kommt, konnte diese Untersuchung nicht feststellen. Wesentliche Variablen wie Formstabilität des Materials, Reaktion des Umgebungsknorpels auf das Material und wichtige PCR-Daten kommen in dieser Publikation nicht zur Darstellung.

Spongostan® eignet sich durch seine einfache Handhabbarkeit. Es kann durch simples Mischen, zum Beispiel mit physiologischer Kochsalzlösung, in eine Konsistenz überführt werden, die je nach Mischungsverhältnis von einer Suspension bis hin zu einer plastilen Masse reicht. In seiner plastilen Konsistenz eignet es sich zur Einpassung in Knorpeldefekte optimal (Abb 7). Eine weitere Präparation des Defektareals ist dafür nicht mehr notwendig. Gerade seine einfache Handhabung macht einen minimalinvasiven Einsatz möglich. Die immunologische Unbedenklichkeit wurde durch seinen jahrzehntelangen klinischen Einsatz belegt. Der Gebrauch, der die Mischung einer Zellsuspension mit dem Spongostan® erlaubt, lässt vermuten, dass es so zu einer homogenen Zellverteilung innerhalb des Trägermaterials kommt. Die feinstrukturelle Beschaffenheit scheint eine hervorragende Porengröße aufzuweisen, die eine Ver- und Entsorgung von eingebetteten Chondrozyten zulässt (Abb 8).

Insgesamt liegen somit viele Anhaltspunkte vor, welche die Untersuchung des Spongostans® als ein potentielles Trägermaterial für die MACT rechtfertigen.



Abb 7 Abbildungen, welche die Variabilität der Form des Spongostans® deutlich machen. Quelle: Johnson& Johnson™

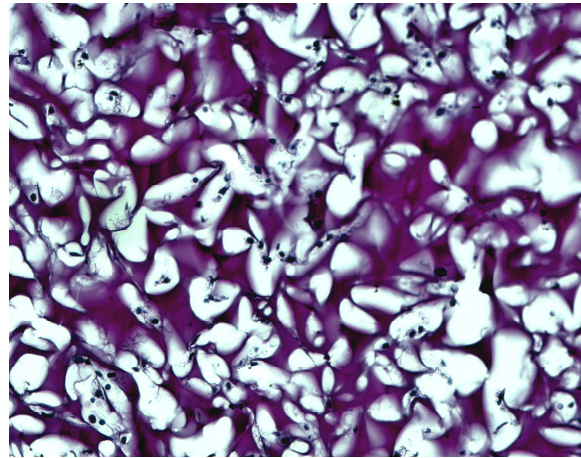


Abb 8 Spongiöse Struktur des Spongostans®

#### 4.6 Ziel

Zielsetzung dieser Arbeit war die Entwicklung eines geeigneten 3D-in-vitro-Kulturmodells für die Untersuchungen zum Wachstums- und Differenzierungsverhaltens von Chondrozyten in dem potentiellen Trägermaterial Spongostan®-Pulver der Firma Johnson& Johnson. Die hierbei gewonnen Ergebnisse dienten als Vergleich zu Monolayerzellkulturen und zu Knorpel-Knochen-Explantatkulturen.

Die folgenden Fragestellungen standen hierbei im Mittelpunkt der Untersuchungen:

- Ist die Formstabilität des Trägermaterials über den Kultivationszeitraum hinweg gegeben?
- Wie ist die Reaktion des Knorpels aus den Defekträndern auf das Implantat?
- Besitzt das Material die nötige Adhärenz, um die Zellen zu beherbergen und ist hierin eine homogene Zellverteilung möglich?
- Sind die Chondrozyten in der Lage, ihren Phänotyp in dem Kulturmodell zu bewahren und bleibt ihre Vitalität erhalten?
- Wie verhalten sich die Chondrozyten hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens auf Protein- und mRNA-Ebene im Vergleich zu anderen Kultursystemen.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Geräte

Autoklav	Certolec Sterilizer GmbH Tischcertoklav
Brutschrank INCO2	MEMMERT
Eismaschine	Scotsman FRIMON AF 80
Elektronenmikroskop	Transmissionselektronenmikroskop CM 10 D871, Phillips
Gel Kammer	Bio-Rad Mini-Sub-Cell GT
Histokinette	Shanon Citodel 1000
Kryostat	Leica CM 1100
Kühlplatte	Leica EG 1130
MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detec- tion System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Magnetrührer	H+P Labortechnik
Microflow Laminar Flow Workstation	Nunc
Microtom	Microm Typ HM 355
Mikroskop	Zeiss Axiovert 200M
QRT-PCR-Maschine, iCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PCR (Polymerase-Chain-Reaktion)	Eppendorf
Machine Master Cycler Gradient,	
Pipetten, Research®, Reference®	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Paraffinbehälter mit Wärmeplatte	Leica EG 1120
Sterilfilter	Schleicher & Schell, Dassel
Thermostat plus Thermoblock	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Ultramikrotom	Leica, Bensheim
Wasser-Filtrieranlage	TKA-LAB Reinstwassersystem Typ HP 6UV/VF
Wasserbad	MEMMERT

Waage	Sartorius BP 1219
Zählkammer Fuchs-Rosenthal	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Zellkultur-Dreihalsgefäß mit Magnetrührer	Wheaton
Centrifuge 5840 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

## 5.2 Chemikalien

Albumin Fraktion V	Merck KgaA, Darmstadt
Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agarose	BIO-RAD High Strength Analytical Agarose
Araldit	Agar Scientific, Stansted–Essex U.K
Chloroform	Merck, Darmstadt
DMEM	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
FKS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gentamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutaraldehyd	Agar Scientific, Stansted–Essex U.K
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Apotheke KIM
β-Mercaptoethanol GR for analysis	Merck, Darmstadt
Osmium VIII oxid:	Sigma-Aldrich, Steinheim
Osteodec	Manfred-Fremdling-Krankenhaus und Laborbedarf, Fürth/Landshut
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Propenoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Syber Green®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tissucol Duo S 1ml Immuno®	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
TRIzol® Reagent	Invitrogen Life Technologies

Uranylacetat	Plano GmbH, Wetzlar
Xylol	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

### 5.3 Enzyme

Collagenase P	Roche, Mannheim
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pronase E	Merck, Darmstadt
RNase Out	Merck, Darmstadt

### 5.4 Färbungen

Alcianblau	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Azur II	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Eosin	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
4',6-Diamidino-2Phenylindole (DAPI)	SIGMA-Aldrich, Steinheim
Hämatoxylin nach Gill	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Kernechtrot	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Perjodsäure	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Propidiumjodid 95%-Pulver	SIGMA-Aldrich, Steinheim
Methylenblau	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Safranin O 1%	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

### 5.5 Antikörper

Aggrecan	Acris Antibodies GmbH, Catalog No SM 1353, monoclonal mouse anti-human, 2ml/n.d., clone HAG7D4
Kol 1	Oncogene, Lot Cp 17L monoclonal-maus
Kol 2	Oncogene, Catalog No CP18L, monoclonal anti-human, clone II-4C11

Kol 3	CALBIOCHEM <sup>®</sup> , Lot D24819, polyclonal rabbit anti-human & anti-mouse & anti-rat & anti-marmoset
Kol 6	abcam, Code ab6588, polyclonal anti-human & anti-bovine, 1mg/ml,
Kol 10	Anti maus, monoclonal, SIGMA-Aldrich
SOX-9	CHEMICON <sup>®</sup> INTERNATIONAL, Lot 25060072, polyclonal anti-human, 0,48mg/ml,
Fluoreszein goat anti-mouse IgG (Zweit-Antikörper)	MoBiTec
Rhodamine Red-X-goat anti-mouse IgG (Zweit-Antikörper)	MoBiTec
Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit (Zweit-Antikörper)	MoBiTec
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Zweit-antikörper)	MoBiTec

## 5.6 Test Kits

Antifade Kit	Antifade Kit, MoBiTec (P-7481)
Omniscript <sup>®</sup> RT Kit	Quiagen Cat#205111

## 5.7 Verbrauchsmaterialien

ChondroGide-Membran <sup>®</sup>	Geistlich, Luzern
Objektträger	Superfrost Plus, Menzel
Paraffin	Paraplast Plus, Merck
Spongostan <sup>®</sup>	Johnson& Johnson <sup>™</sup>
Tubes, 50 ml	BD Falcon <sup>™</sup>
Zellkulturschalen	BD Falcon <sup>™</sup>

## 5.8 Computersoftware

Adobe Photo Shop 7.0	Adobe Systems, Inc.
Literaturverwaltung	End Note 6.0
Mikroskopsteuerung	Axiovert Vision 3.0, Carl Zeiss Vision GmbH
Icycler Optical System Software©	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Microsoft Office 2003©	Microsoft Corporation™

## 5.9 Puffer und Lösungen

Angaben für einen Liter Lösungspuffer:

Cacodylatpuffer: Stammlösung: 21,4 g / Liter a.d. = 0,1 M+ 20 ml 0,1 n HCl

DMEM/F12: 12,0g Trockenpulver (Sigma™) + 1,2 g NaHCO<sub>3</sub> + 1l reinst H<sub>2</sub>O + 1ml Gentamycin

PBS:(pH 7,4):8,0 g NaCl + 1,18 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,4 g KCL + 0,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

TBE: 0,1 mol Tris (12,4g) + 1,8 µmol EDTA (0,74g) + 0,09 mol H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (5,6g) + a.d.

TRIS-Puffer: 0.05 M Tris, 0.11 M NaCl mit HCl auf pH. 7.5 einstellen

## 5.10 Methoden

### 5.10.1 Präparation der bovinen Kniegelenke und Gewinnung der Zellkulturbestandteile

Die Versuche wurden alle mit hyalinem Gelenkknorpel boviner Knie durchgeführt. Die Knie wurden bereits gehäutet von einem örtlichen Schlachthof bezogen, wo auch das Zerschneiden des Femur- und Tibiaanteils auf eine Gesamtlänge von ca. 30-40 cm erfolgte. Zur weiteren Präparation wurde das Knie auf femoraler Seite in einen Kettenschraubstock eingespannt. Alle verwendeten Werkzeuge waren entweder steril verpackt oder wurden mit 70% Ethanol desinfiziert. Vor Beginn der Präparation erfolgte eine



gründliche Desinfektion der Kniegelenke mit 70% Ethanol, was bis zur vollständigen Eröffnung der Gelenkhöhle mehrfach wiederholt wurde.

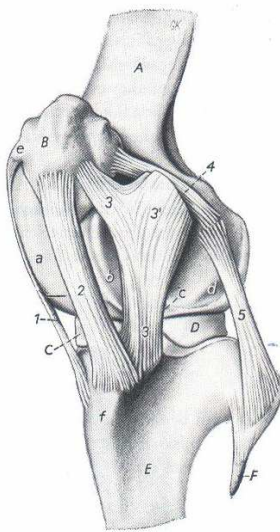


Abb 9 Linkes, bovines Kniegelenk, aus Nickel R, Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, 1992

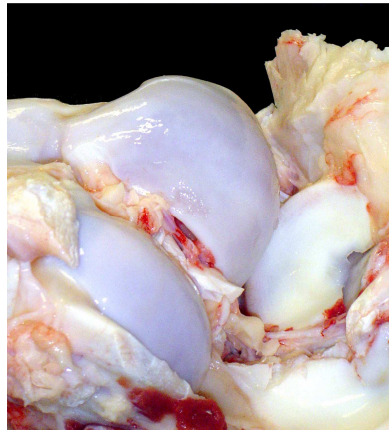


Abb 10 Eröffnetes bovines Kniegelenk

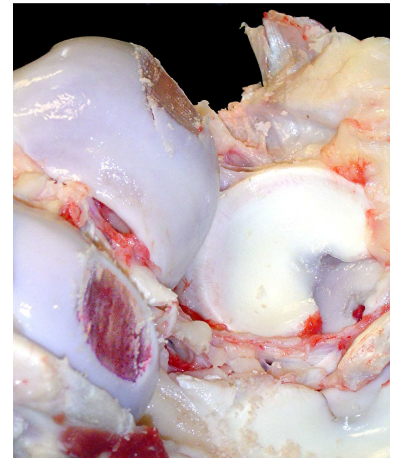


Abb 11 Femurkondylen nach der Ernte der Knorpel-Knochen-Explantate

In Höhe des Gelenkspalts wurden zunächst die Faszien und anschließend die Muskelschichten des distalen M. quadriceps femoris durchtrennt. Danach erfolgte die Eröffnung der Gelenkhöhle, indem die Ligg. collaterale laterale (5) et mediale, die Ligg. mediale (1), intermedius (2) et laterale femoropatellaris (3) sowie die Endsehne des M. biceps femoris (3') durchtrennt wurden. Abschließend wurden noch die Ligg. cruciatum anterius et posterius durchtrennt, so dass so ein vollständiges Anteflektieren der Tibia gegenüber dem Femor möglich war (siehe Abb. 9).

Hiernach begann die Präparation der Knorpel-Knochen-Explantate, indem diese von den distalen Femurkondylen abgesägt wurden. Die so gewonnen Knorpel-Knochen-Explantate wurden in PBS gründlich von Knochenspänneresten gereinigt und anschließend in DMEM/F 12, welches 5 % FCS und Gentamycin (1ml/l DMEM) enthielt, über Nacht in die Zellkultur bei 37° C genommen.

### 5.10.2 Präparation von Chondrozyten aus nativem Knorpel

Aus der femoropatellaren Gleitbahn erfolgte die Entnahme von Knorpelstücken, die alle typischen Knorpelzonen beinhalteten. Hieraus erfolgte die Gewinnung der Chondrozyten, die in den unterschiedlichen Versuchsansätzen verwendet wurden.

Die Gewinnung von Chondrozyten aus Knorpelstücken unterteilte sich in die folgenden Einzelschritte:

- Gründliches Reinigen der Knorpelstücke von Blut und Geweberesten mit PBS, um so eine vorzeitige Absättigung der zum Knorpelverdau eingesetzten Enzyme zu verhindern.
- Überführung der Knorpelstücke in ein Rührgerät von Wheaton®.
- Zugabe von serumfreien DMEM/F12, das mit Gentamycin und Pronase E (1mg/ml DMEM) supplementiert und durch einen 0,2µm Filter steril filtriert wurde. Hiermit wird ein Vorverdau von Proteinen erzielt. Der Ansatz wurde für eine Stunde in den Brutschrank gebracht.
- Absaugen des Mediums und anschließend dreimaliges Waschen der angedauten Knorpelstücke mit PBS.
- Zugabe von DMEM/F12, das mit 5% FCS, Gentamycin und Kollagenase (0,1mg/ml DMEM) supplementiert und durch einen 0,2 µm Filter steril gefiltert wurde. Dieser Ansatz wurde über Nacht für mindestens 17 h im Brutschrank belassen und führte zum vollständigen Verdau der Knorpelstücke.

Die so erhaltene Zellsuspension wurde in 50 ml Röhrchen überführt. Daraufhin wurden die Zellen bei 1500 rpm abzentrifugiert, durch dreimaliges Resuspendieren und Abzentrifugieren in PBS gereinigt. Anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Dabei wurden 16 Kleinst-quadrate ausgezählt, um unter Zuhilfenahme der Formel „gezählte Zellzahl x 5000 x Verdünnungsfaktor der Zellsuspension“, die endgültige Zellzahl berechnen zu können.

Je nach durchgeführtem Experiment, wurden die Zellen in unterschiedlicher Zellzahl zunächst in Zellkulturgefäße ausgesät, die eine Fläche von 75 cm<sup>2</sup> besaßen.

## 5.10.3 Herstellung eines 3D-in-vitro-Kulturmodells

Um das Verhalten von Chondrozyten in dem dreidimensionalen Trägersystem Spongostan® in möglichst naturgetreuer Umgebung studieren zu können, stand die Entwicklung eines hierfür geeigneten Kultursystems im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Da für die Regeneration eines Knorpeldefekts nicht nur der den Defekt umgebene Knorpel wichtig ist, sondern auch dem subchondralen Knochen (Rodan GA 1992, Reddi A 1998, Hunziker EB 2002) eine entscheidende Funktion zukommt und dieser nicht zuletzt auch häufig einen zusätzlichen Defekt aufweist, wurde ein Hybridkulturmodell gewählt, das neben dem Trägersystem Spongostan® auch den Umgebungsknorpel und den subchondralen Knochen mit einbezog.

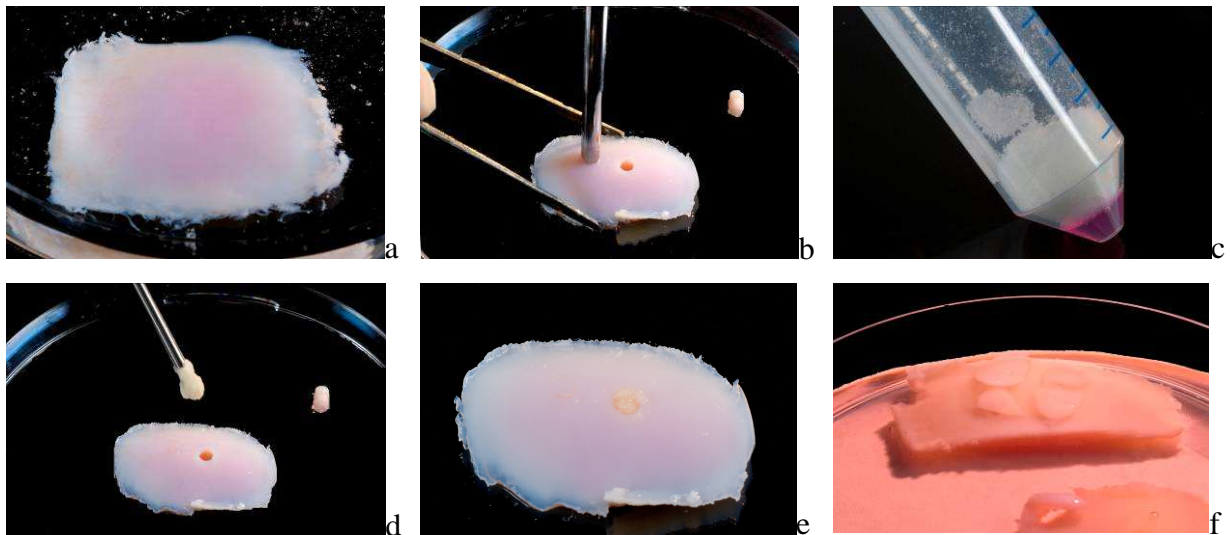


Abb. 12 Darstellung der Herstellung des 3D-In-vitro-Modells

a) Knorpel-Knochen-Explantat

b) Ausstanzen der Löcher

c) Mischen des Implantats

d) Einpflanzen des Implantats; plastilene Masse an der Vorderseite des Metallstabes.

e) Implantat im Defekt

f) Fertiges Modell in der Zellkultur

Hierfür wurde aus den Knorpel-Knochen-Explantaten Defekte gestanzt, die einen Durchmesser von 2,5 mm hatten und sowohl den Knorpel als auch den subchondralen Knochen mit einbezogen. Die Knorpel-Knochen-Explantaten wurden danach wiederum in serumhaltiges DMEM gegeben und bis zur Fertigstellung des Implantats zurück in den Brutschank gegeben, um ein zwischenzeitliches Austrocknen des Knorpels zu vermeiden.

Den Zellen wurde vor Beginn der Herstellung des Implantats eine Ruhezeit von ca. sechs Stunden gewährt. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei entsprechend guter Vitalität der Chondrozyten bereits die einsetzende Matrixsynthese der Zellen beobachtet werden, was makroskopisch als ein weißer Flockenteppich in den Zellkulturgefäßen imponierte. Die Chondrozyten wurden mit einer 25 ml Pipette den Zellkulturschalen entnommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. In dem Röhrchen wurde die Zellsuspension mehrmals resuspendiert, um die Zellen voneinander zu lösen. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und der Medienüberstand verworfen.

Die hergestellten Implantate enthielten 0,15 g Spongostan® und 300 µl DMEM + 5% FCS. Dieses Implantat wurde dann auf die einzelnen Defekte verteilt. Das Zellpellet wurde, bevor das Mischen mit dem Spongostan erfolgte, durch Resuspendieren mit dem DMEM zu einer homogenen Zellsuspension vermischt. Unter ständigem Rühren wurde anschließend schrittweise das Spongostan® auf die Zellsuspension gegeben. Bei dem oben angegebenen Mischungsverhältnis resultierte aus diesem Vorgehen ein Implantat, das einer plastilen Masse entsprach und eine Zellzahl beinhaltete, die in den einzelnen Experimenten zwischen 20 und 40 Millionen Zellen schwankte.

Mit einer vergleichbar hohen Zelldichte konnte in anderen Materialien die suffizientesten Implantate hergestellt werden (Puelacher WC 1994, Lu 2001). Weiterhin wird in der Literatur auch die Meinung vertreten, dass eine Zellzahl, die zehn Millionen Zellen/ml im Implantat unterschreitet, nur zu einer geringen oder gar keinen Knorpelformation führt (LeBaron RG 2000, Lu 2001).

Durch die hervorragenden physikalischen Voraussetzungen des Implantats konnten die Stanzlöcher der Knorpel-Knochen-Explantate lückenlos ausgefüllt werden.

Um eine möglichst abgeschlossene Brutkammer für das Implantat zu erzeugen, wurden die Löcher von der knöchernen Unterseite und der chondralen Oberseite mit einer ChondroGide®-Membran mit Hilfe von Fibrinkleber beklebt.

Im Ergebnis resultierte aus diesem Procedere das im Schema dargestellte und oben unter Abbildung 4 (f) zu sehende 3D-In-vitro-Kulturmodell

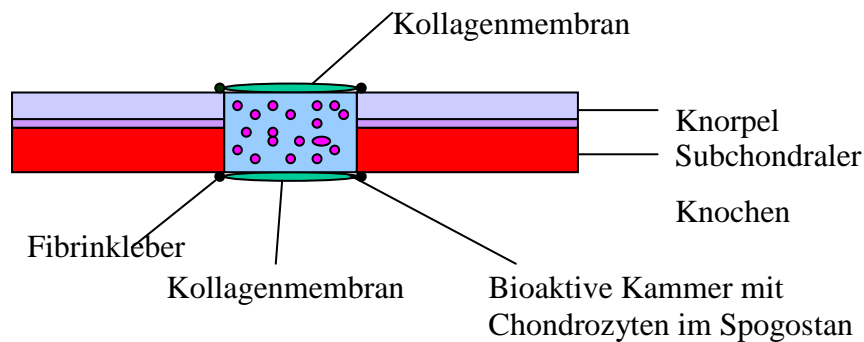


Abb 13 Schema des 3D-in-vitro-Kulturmodells

#### 5.10.4 Referenzkulturen

Zu Kontrollzwecken wurde das Verhalten von Chondrozyten in ihrer angestammten natürlichen dreidimensionalen Anordnung untersucht. Hierfür wurden Knorpel-Knochen-Explantate kultiviert und ihre Veränderungen mit frischem hyalinem Knorpel verglichen. Auf Grund der oben beschriebenen wichtigen Aufgabe, die der subchondrale Knochen für die Integrität des hyalinen Knorpels ausfüllt, wurde der Kontrollkulturansatz so gewählt, dass hyaliner Knorpel gemeinsam mit seinem subchondralen Knochen kultiviert wurde. Um eine Vergleichbarkeit zu zweidimensionalen Kultursystemen herstellen zu können, wurden zusätzlich Monolayerzellkulturen angelegt. In der Literatur (Adolphe M 1992, Huch K 2002) wird die typische Zelldichte in Monolayerkulturen mit  $5 \times 10^3$  bis  $16 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  beschrieben. In dieser Arbeit wurden Monolayerkulturen verwendet, in denen entweder  $5 \times 10^5$  oder  $1 \times 10^6$  Zellen kultiviert wurden. Für die Kultivation wurden Zellkulturgefäße eingesetzt, die eine Fläche von  $75 \text{ cm}^2$  besaßen. Die Zelldichte in den Monolayerkulturen betrug folglich  $\approx 6,7 \times 10^3$  bzw.  $\approx 13,3 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  und lag damit in dem Bereich, der in der Literatur beschrieben wurde.

#### 5.10.5 Zellkulturbedingungen

Um einer Kontamination der Zellkulturen mit Bakterien oder Pilzen vorzubeugen, wurden alle Versuchsansätze unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Des Weiteren waren alle Arbeitsgeräte steril verpackt. Jene, die nicht steril verpackt waren, wurden mit 70% Ethanol desinfiziert.

Die Kultivation erfolgte für drei Wochen in DMEM/F12, welches mit 5% FKS und Gentamycin (1ml/l DMEM) supplementiert war. Die Atmosphäre im Brutschrank hatte eine Temperatur von 37°C, einen CO<sub>2</sub> Gehalt von 5% und eine relative Luftfeuchtigkeit von 95%. Der Wechsel des Nährmediums erfolgte zweimal pro Woche.

#### 5.10.6 Auswertung

Nach drei Wochen Kultivation erfolgte die Ernte der Zellkulturen.

Die Ernte und Weiterbehandlung der Proben gestaltete sich im Hinblick auf die späteren Auswertungsverfahren unterschiedlich. Die Auswertung wurde mit Hilfe der konventionellen Färbemethoden H&E und Alcianblau, der Immunhistologie, der Elektronenmikroskopie und der qualitativen sowie der quantitativen Real-Time-PCR durchgeführt.

##### 5.10.6.1 Histologie

###### 5.10.6.1.1 Entnahme der Zellkulturen für die Histologie

Alle Proben für weitere histologische Untersuchungen wurden zunächst für sechs Stunden in 4% Paraformaldehyd aufgenommen.

Einige der Proben, die im ganzen (Spongostan®-in-vitro-Modell oder komplettes Knorpel-Knochen-Explantat) für das Einbetten in Paraffin vorgesehen waren, wurden im Anschluss zusätzlich für 24h in Osteodec® entkalkt. Zu-



Abb 14 Ausgestanzte Implantate nach drei Wochen Kultur.

sätzlich wurden noch Proben in Tissue Tec® eingebettet. Hierfür wurden die Spongostanimplantate wieder aus dem Defekt des Spongostan®-in-vitro-Modells herausgestanzt. Von den kultivierten Knorpel-Knochen-Explantaten wurde der Knorpel bis zur subchondralen Knochenplatte abgetrennt. Die im Monolayer gewachsenen Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturplatte gekratzt. Im Anschluss wurden alle Proben im Tissue-Tec® bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

#### 5.10.6.1.2 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Die konventionellen Färbemethoden H&E sowie Alcianblau mit  $6\text{ }\mu\text{m}$  dicken Schnitten durchgeführt, die von in Paraffin eingebetteten Proben gewonnen wurden.

Hierfür wurden die Paraffinschnitte nach dem Entparaffinieren ( $1 \times 20\text{ min}$ ) in einer Reihe von Waschschritten, beginnend mit einer in der Konzentration absteigenden Ethanolreihe, gefolgt von destilliertem Wasser, in ein anorganisches Milieu gebracht.

Die immunhistologischen Untersuchungen wurden anhand der in Tissue Tec® eingebetteten Proben als Kryostatschnitte durchgeführt. Die Kryostatschnitte wurden bei einer Temperatur von  $-30^{\circ}\text{C}$  hergestellt und hatten eine Dicke von  $6\mu\text{m}$ .

Für die Färbung der Kollagene-Typ I-III, VI und X wurden die Kryostatschnitte zunächst für eine halbe Stunde mit Hyaluronidase vorbehandelt. Hierdurch wird Hyaluronan gespalten, das in allen Binde- und Stützgeweben zu finden ist, und es kommt so zur Demaskierung spezifischer Oberflächenantigene der Kollagene, die dann in der Immunhistologie dargestellt werden können (Heinzeller T 2001). Danach wurden die Schnitte mehrfach mit TBS gewaschen und standen so der weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

Für die immunhistochemische Darstellung des Aggrekans und des SOX-9 wurden die Schnitte vor dem eigentlichen Färben kurz in TBS gewaschen.

#### 5.10.6.1.3 Färbung der Gewebeschnitte

Die H&E Färbung diente der Übersichtsdarstellung sowie der Darstellung des Phänotyps der Chondrozyten in den Zellkulturen. Soweit dies nicht anders beschrieben wird, handelt es sich bei den verwendeten Färbelösungen um gebrauchsfertige Färbelösungen. Hierfür

wurden die Schnitte zunächst für zehn Minuten in Hämatoxylin nach Gill inkubiert, anschließend in a.d. gewaschen und dann für 10 min in Eosin inkubiert.

Für die Darstellung der Glykosaminoglykane wurde die Alcianblaufärbung angewendet (Romeis 1989). Dazu wurde nach dem Herstellen eines sauren Milieus mit 3% Essigsäure im ersten Schritt eine 30-minütige Färbung mit einer 1% Alcianblau-Lösung 8GX (pH 2,5) durchgeführt. Daraufhin erfolgte in einem zweiten Schritt die Gegenfärbung der Zellkerne mit Kernechtrot für 4 min. Nach einer Waschung mit a.d. erfolgte das übliche Überführen in ein organisches Milieu durch die aufsteigende Alkoholreihe, gefolgt von zweimaligem Waschen mit Xylol und Einbettung der Schnitte in Canada-Balsam.

Zur Darstellung der knorpelspezifischen Proteine (Kollagen-Typ II, VI und Aggrekan) sowie der Proteine, die als Dedifferenzierungsmarker dienen (Kollagen-Typ I und III) wurde die Immunhistologie durchgeführt, um so genaue Aussagen über die Lokalisation dieser Proteine in den Zellkulturen machen zu können. Bei der Immunhistologie bindet sich ein Erstantikörper an ein spezifisches Oberflächenantigen. An diesen Erstantikörper wird schließlich in einem zweiten Reaktionsschritt ein Zweitantikörper gebunden, an dem ein Fluoreszenzfarbstoff als Marker gekoppelt ist und der bei Anregung durch eine spezifische Wellenlänge detektiert werden kann.

Die Antikörper wurden mit Albumin-Tris (0,03 g Albumin/ 1 ml TRIS Puffer) in ihre Endkonzentration gebracht (1:10-1:100-AK/ Albumin-Tris). Anschließend wurden die Erstantikörper auf die vorbehandelten Gewebeschnitte aufgetragen und über Nacht im Kühlschrank bei 5°C gelagert. Danach wurden die Schnitte mehrfach gründlich in TBS gereinigt, der Zweitantikörper (1:100 AK/ Albumin-Tris) auf die Schnitte aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter lichtgeschützten Verhältnissen gelagert.

Anschließend wurden die Schnitte wiederum gründlich in TBS gewaschen und als letzter Färbeschritt zur Lokalisation der Zellkerne die DAPI- Kernfärbung (0,5 µg/ ml) oder Propidiumjodid-Färbung (1:100 Propidiumjodid/ PBS + 0.1 % Triton X-100) durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte mit der Färbelösung beschichtet und ebenfalls unter lichtgeschützten Bedingungen für 5 bzw. 10 min bei Raumtemperatur gelagert. DAPI ist ein Farbstoff, der in der Lage ist Zellmembranen lebender Zellen zu durchdringen und an die AT-reichen Sequenzen der DNA zu binden. Bei der Propidiumjodid-Färbung wurde 0,1% Triton X-100 zugefügt, um die Permeabilität der Zellmembranen zu erhöhen.



Nach kurzem Waschen in a.d. wurden die Schnitte im trockenen Zustand in ein Antifade-Kit eingedeckt.

Um unspezifische Antikörperreaktionen bei Immunhistologie ausschließen zu können, wurde neben jedem der untersuchten Schnitte parallel ein Kontrollschnitt angefertigt, der nur mit dem Sekundärantikörper beschichtet wurde.

#### 5.10.6.1.4 Elektronenmikroskopie

Für die Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate wurde das Nativmaterial auf eine Größe von ca.  $1\text{ mm}^2$  präpariert.

Die Fixierung des Materials erfolgte in 4% Glutaraldehyd, gefolgt von einem dreimaligen, fünfminütigen Waschen der Präparate mit 0,1 m Cacodylat (pH 7,2). Daraufhin wurden die Präparate in einem ersten Schritt mit 1% Osmium-VIII-oxid kontrastiert, wiederum gefolgt von einem dreimaligen, fünfminütigen Waschen mit Cacodylatpuffer.

Hierauf folgte die Entwässerung der Präparate mit einer aufsteigenden Acetanreihe (30% -15 min und 50% -15 min). Der Entwässerung folgte der Schritt der zweiten Kontrastierung mit 2% Uranylazetat (70% -15 min, 96% -3x 8 min und 100% -3x 8 min) und hiernach zur Restentwässerung reines Propylenoxid für 3 min.

Als letzter Schritt vor dem Schneiden der Präparate erfolgte die Infiltration der Präparate mit Araldit. Die Aralditmischungen wurden mit Propylendioxid in ihre Endkonzentration gebracht (1:2, 1:1, 2:1 Araldit:Propylendioxid). Danach wurden die Proben für jeweils eine Stunde in jede Aralditkonzentrationen gebracht. Abschließend wurden die Proben noch für eine Stunde in reines Araldit gegeben, daraufhin in Formen gegossen und für 48 Stunden in einem Brutschrank bei 60°C belassen. Nun erfolgte das Schneiden der Präparate mit einem Diamant-Ultramikrotom.

In einem ersten Schritt wurden hierfür Semidünnschnitte von 1  $\mu\text{m}$  Dicke hergestellt, die der Übersichtsdarstellung des Präparats dienten. Die Schnitte wurden nach „Richardson“ in einer Färbelösung bestehend aus 1% Perjodsäure, 1% Azur II und 1% Methylenblau (Mischungsverhältnis 1: 1: 2) für 15 min bei 60° C gefärbt.

Entsprachen die angeschnittenen Stellen des Präparats den Stellen, die zur Darstellung kommen sollten, so wurden hiervon Ultradünnschnitte angefertigt. Die Ultradünnschnitte

wurden auf Netzblenden aufgezogen. Auf den Netzblenden wurden die Schnitte einer dritten Kontrastierung unterzogen, indem sie für 5 min bei Raumtemperatur in ein Gemisch aus  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , Na-Citrat und NaOH gebracht wurden. Der Kontrastierung folgte ein gründliches Waschen in a.d.

Zum Schluss wurden die Schnitte getrocknet und unter dem Elektronenmikroskop untersucht.

#### 5.10.6.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

##### 5.10.6.2.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion, die durchgeführt wurde, unterteilt sich in die Einzelschritte Homogenisierung der Proben, Phasentrennung, RNA-Präzipitation, RNA-Waschen und Auflösen der RNA

Für die RNA-Extraktion wurden aus dem 3D-in-vitro-Modellen die Implantate, wie oben unter 5.10.5.1.1 bereits beschrieben, wieder herausgestanzt. Von den Knorpel-Knochen-Explantaten wurden Knorpelstücke, die eine Größe von ca.  $1 \text{ cm}^2$  hatten, bis zum subchondralen Knochen abgetrennt.

Um eine Homogenisierung und Lyse der Proben zu erreichen, wurden die Knorpelstücke und auch die Spongostanimplantate in jeweils 1 ml Trizol® überführt. Im Trizol® wurden die Proben mit einer zuvor abgeflammt Schere maximal zerkleinert. Anschließend wurde dieser Ansatz für 15 min inkubiert und die noch verbliebenen Gewebereste abzentrifugiert. Bei den Monolayerkulturen genügte es, mit der Pipette das Trizol® langsam über die Zellkulturschale laufen zu lassen. Dies führte zum einen dazu, dass sich der Zellrasen vom Grund der Zellkulturschale löste und zum anderen konnte so durch mehrmaliges Resuspendieren eine Homogenisierung und Lyse der Zellen erreicht werden.

Beim sich anschließenden Schritt der Phasentrennung wurde zunächst das Trizol®-Gemisch für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine komplette Dissoziation des Nucleoproteingemisches zu bekommen. Die Phasentrennung wurde beschleunigt, indem dem Trizol®-Gemisch 200  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzugefügt wurde. Nach dem Zentrifugieren für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 12000 rpm enthielt das Probenröhrchen eine gelbliche bis

wässrige Phase und eine rote Phase. Die wässrige Phase, in der sich die RNA befand, wurde in ein neues Probenröhrchen überführt.

Der wässrigen Phase wurde im sich anschließenden Schritt der RNA-Präzipitation 500 µl Isopropanol hinzugefügt. Die Probe wurde dann bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert und anschließend für 10 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgesaugt worden war, wurde am Grund des Probenröhrchens die RNA als Pellet sichtbar.

Die RNA wurde zum Schluss noch in 700 µl 75% EtOH zweimal gewaschen und in RNA-freiem Wasser aufgelöst. Die Lagerung der aufgelösten RNA erfolgte bei -20°C.

#### 5.10.6.2.2 Reverse Transkription

Im Anschluss an die RNA-Isolation erfolgte das Umschreiben der RNA in cDNA.

Hierbei wurde nach dem folgenden Protokoll verfahren:

Zunächst wurde die RNA-Probe für 5 min bei 65° C denaturiert.

Hieran anschließend erfolgte die Inkubation von 20 µl gelöster RNA-Probe bei 37° C für eine Stunde mit 4 µl 10xRT-Puffer, 4 µl dNTP, 4 µl Oligo-dT, 4 µl RNase-freies Wasser, 2 µl Reverse Transkriptase und 2 µl RNase-Out.

Die hierdurch gewonnene cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

#### 5.10.6.2.1 Die RT-PCR

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem spezifische Gensequenzen gezielt vermehrt werden. Während mit der RT-PCR lediglich der qualitative Nachweis dieser Gensequenzen möglich ist, ist mit der Real-Time-PCR (Synonym: qRT-PCR) auch ein quantitativer Nachweis möglich.

Um die durch reverse Transkriptase gewonnenen spezifischen DNA-Sequenzen für ihren Nachweis in ausreichender Menge mit Hilfe der qualitativen PCR zu amplifizieren, wurde entsprechend folgendem Protokoll vorgegangen:

PCR-Ansatzes: 2 µl cDNA-Probe + je 1 µl Primer (10 µmol) upstream und downstream + 12,5 µl Master Mix (Qiagen) + 8,5 µl reinstes H<sub>2</sub>O.

Der Master Mix (Qiagen) setzte sich wie folgt zusammen: 2,5 U Taq DNA Polymerase, 1x PCR Puffer (Qiagen enthält 1,5 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu M$  je dNTP)

Mit diesem Verfahren erfolgten insbesondere die Untersuchungen auf das Vorhandensein der Entzündungsparameter IL-1 und VEGF.

#### 5.10.6.2.3 Die Real-Time-PCR

Das Verfahren der Real-Time-PCR beruht auf der Messung eines Fluoreszenzsignals, welches durch fluoreszierende, nukleinsäurebindende Farbstoffe oder genspezifische Sonden, die mit einem Fluoreszenzmarker markiert wurden, erzeugt wird.

In dieser Arbeit wurde der nukleinsäurebindende Farbstoff SyberGreen® verwendet. SyberGreen® fluoresziert, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden ist (Abb. 16). Die Anregung von SyberGreen® erfolgte mit einer Wellenlänge von 497 nm; die Emmission wurde bei 520 nm gemessen.

Am Ende eines jeden Amplifikationszyklus kann dann ein Intensitätsanstieg gemessen werden. Die Messung beginnt, nachdem ein dem Gen zugewiesener Schwellenzyklus überschritten wurde (Abb. 15) und erfolgt im ansteigenden Teil der sigmoiden Reaktionskurve.

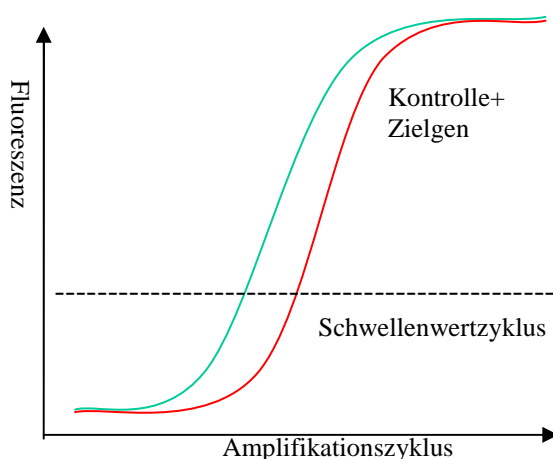


Abb. 15 Messprinzip der Real-Time-PCR. Messung im ansteigenden Teil der Fluoreszenzkurve nachdem ein Schwellenwert überschritten wurde.

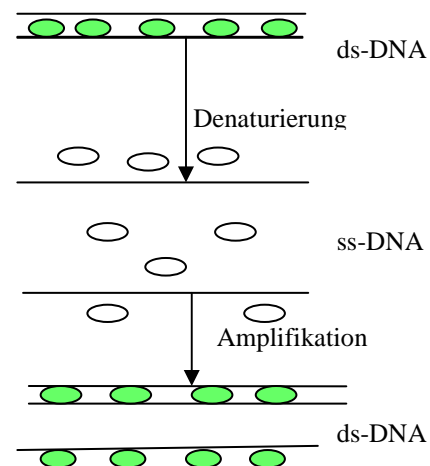


Abb. 16 Wirkungsprinzip des SyberGreens®, das an doppelsträngige DNA gebunden fluoresziert.

Der Nachteil von nukleinsäurebindenden Farbstoffen besteht darin, dass sie sich auch an unspezifische doppelsträngige DNA-Sequenzen binden. Daher wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenbestimmung durchgeführt, um die auf unspezifischen Fluoreszenzsignalen beruhenden Werte eliminieren zu können (Abb. 17). Das Messprinzip beruht dabei auf der Tatsache, dass die DNA über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird und entsprechend dem unterschiedlichen Guanin-Cytosin (GC)-Gehalt und der Länge der Amplifikationsprodukte unterschiedliche Schmelzpunkte aufweist, die bei größerer Länge und höherem (GC)-Gehalt zunehmen.

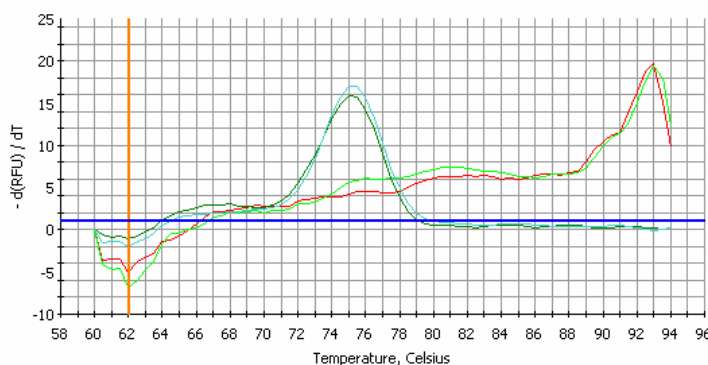


Abb. 17 Beispiel für Schmelzkurvenanalyse (Koll VI Monolayer vs. kultiviertes Knorpel-Knochen-Stück): Der peak bei 75°C wird von Primerdimere erzeugt (Koll VI Monolayer), d.h. hier ist kein PCR-Produkt enthalten. Bei 93°C resultiert der peak vom PCR-Produkt.

Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes wurde anhand eines parallel zu der Probe amplifizierten Standards bekannter Kopienzahl und einer hieraus abgeleiteten Regressionsgeraden, durchgeführt. Eine andere Möglichkeit die Bestimmung vorzunehmen, ist die Quantifizierung eines der „Housekeeping-Gen“. Anschließend kann das Zielgen auf dieses „Housekeeping-Gen“ normalisiert werden. In dieser Arbeit wurde das „Housekeeping-Gen“ GAPDH quantifiziert und alle untersuchten Zielgene wurden auf dieses Gen normalisiert.

In einem Reaktionsansatz wurden die folgenden Einzelkomponenten verwendet: cDNA 9,5 µl + 10 µl SyberGreen® + Primer A 0,3 µl + Primer B 0,3 µl.

Alle cDNA-Proben wurden zuvor mit RNase freiem Wasser 1:20 vorverdünnt.

Die Reaktionsbedingungen waren für alle untersuchten Zielgene gleich und wurden nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Zyklus 1:	( 1x)	Schritt 1:	95,0°C für 03:00 min
Zyklus 2:	( 40x)	Schritt 1:	94,0°C für 00:20 min
		Schritt 2:	60,0°C für 00:20 min
		Schritt 3:	72,0°C für 00:20 min

## Datensammlung und Real-Time-Analyse

Zyklus 3: ( 1x) Schritt 1: 95,0°C für 01:00 min

Zyklus 4: ( 70x) Schritt 1: 60,0°C für 00:30 min

## Datensammlung für Schmelzkurvenbestimmung

Zyklus 5: ( 1x) Schritt 1: 10,0°C HALTEN.

Bei allen Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, um etwaige Pipetierfehler zu minimieren.

Die im Folgenden aufgeführten Zielgene wurden mit den auf der linken Seite aufgelisteten Primern untersucht. Bei allen Primern handelt es sich um bovinspezifische Primersequenzen.

Primer	5' .....3'
Upstream Primer GAPDH:	CATCACTGCCACCCAGAAGA
Downstream Primer GAPDH:	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
Upstream Primer Aggrecan:	ACTTCCGCTGGTCAGATGGA
Downstream Primer Aggrecan:	TCTCGTGCCAGATCATCACC
Upstream Primer Koll I $\alpha$ 2:	CTCAGACCCAAGGATTATGAAG
Downstream Primer Koll I $\alpha$ 2:	GGATCCTTGCAGAATGACAG
Upstream Primer Koll II $\alpha$ 1:	CATCTGGTTTGGAGAAACCATC
Downstream Primer Koll II $\alpha$ 1:	GCCCAGTTCAGGTCTCTTAG
Upstream Primer Koll III $\alpha$ 1:	GATGGGGTCAAATGAAGGTGA
Downstream Primer Koll III $\alpha$ 1:	TGCTCTGAAAATGGGCTAGGA
Upstream Primer Koll VI $\alpha$ 2:	AGAAGGGCAACATGGGTGAG
Downstream Primer Koll VI $\alpha$ 2:	TTCTTTTGCCCCATTCTC
Upstream Primer Koll X $\alpha$ 1:	GGCCGTTTGTAGTGCCAAT
Downstream Primer Koll X $\alpha$ 1:	GGAGCCACCAAGAATCCTGA
Upstream Primer SOX-9:	CCTCCTGAACAGGAAGGAAT
Downstream Primer SOX-9:	AGGAGGAAGGCTCTGTGAATTG

Upstream Primer IL-1 alpha	G A G A A T G T G G T G A T G G T G G C A G
Downstream Primer IL-1 alpha	G G C A T C T C C T T T A G C A A G A C G G
Upstream Primer VEGF	A A G T G G T C C C A G G C T G C A
Downstream Primer VEGF	A T C T C T C C T A T G T G C T G G C C

## 6. Ergebnisse

### 6.1 Das Verhalten des Spongostanimplantats in der Zellkultur

#### 6.1.1 Die Stabilität des Implantats in der Zellkultur

Bei der Entnahme der Implantate aus der Zellkultur wurde in einem ersten Untersuchungsschritt ihre Stabilität beurteilt. Dabei zeigte sich, dass einige Implantate bereits an der Oberfläche mit den Kollagenmembranen verwachsen waren (Abb. 18). Die Stabilität der Implantate war von solcher Güte, dass es bei einigen von ihnen möglich war, sie mit dem Anheben der Membranen aus dem Stanzloch zu ziehen.

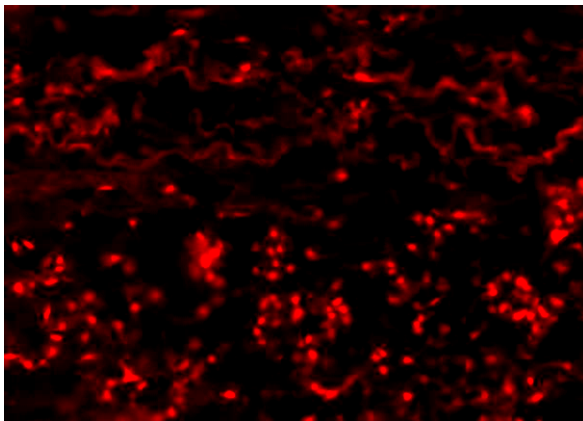


Abb. 18 Verwachsenes Spongostanimplantat mit der Kollagenmembran. Zu beachten, oben im Bild die gewellten kollagenen Fasern der ChondroGide®-Membran, darunter die fluoreszierenden Zellkerne aus dem Implantat, die teilweise auch schon zwischen den Kollagenfasern der Membran nachweisbar sind, Prodigiumjodid-färbung, 20x

Darüber hinaus war zu erkennen, dass die Stanzlöcher nach wie vor lückenlos mit dem Implantatmaterial gefüllt waren (Abb. 19). Bei keinem der Experimente konnte eine Schrumpfung des Implantats festgestellt werden. Die Form der Implantate entsprach immer noch der Form der ursprünglich ausgestanzten Knorpel-Knochen-Zylinder (Abb. 20 und 21).



Abb. 19 Lückenlos gefüllte Stanzlöcher nach Kultur.



Abb. 20 Spongostanimplantate nach dem Herausstanzen.

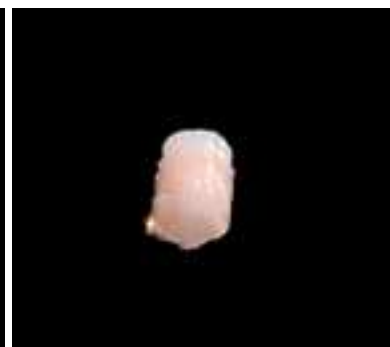


Abb. 21 Ausgestanzter Knorpel-Knochen-Zylinder



### 6.1.2 Das Verhalten des Implantats gegenüber dem Umgebungsknorpel

Die genaue Untersuchung der Interaktionsfläche zwischen Knorpel und Spongostanimplantat erfolgte mittels Elektronenmikroskopie. In der Übersichtsdarstellung nach „Richardson“ war eine enge Verbindung des Implantats mit dem Knorpel zu erkennen (Abb. 22). Vor Beginn der Kultivierung lagen die Kollagenfasern des Knorpels in vom Implantat unabhängiger Ausrichtung neben dem Implantat vor (Abb. 23).

Nach der Kultivierung war eine partielle Orientierung der Kollagenfasern zum Implantat hin zu beobachten (Abb. 24-25).

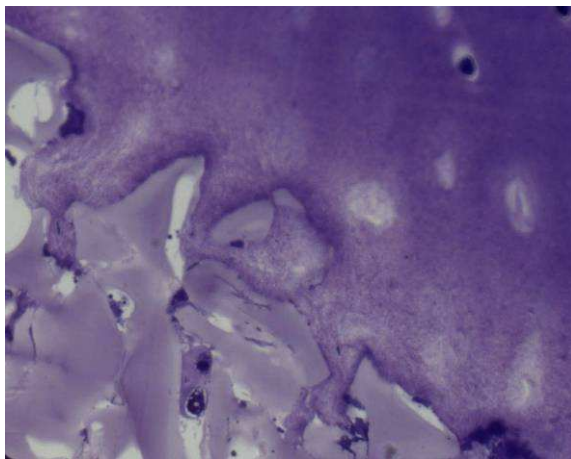


Abb. 22: Semidünnschnitt nach „Richardson“, Zu beachten, die enge Verbindung zwischen Implantat und Knorpel, 40x

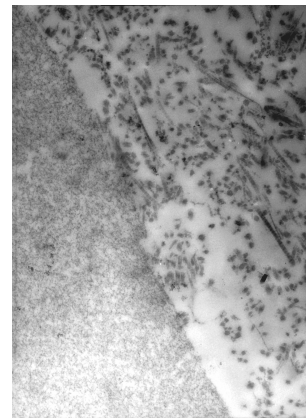


Abb. 23: Unabhängige Ausrichtung der Kollagenfasern des Randknorpels (rechte Bildhälfte) vor Kultivierung, EM 11500x

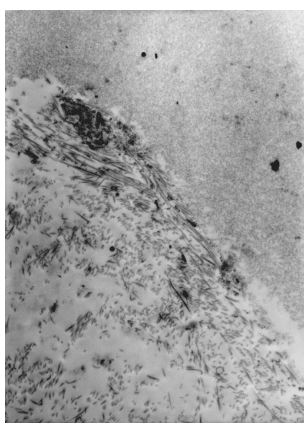


Abb. 24: EM Übersichtsdarstellung. Orientierung der Kollagenfaser in Richtung Implantat, 6000x

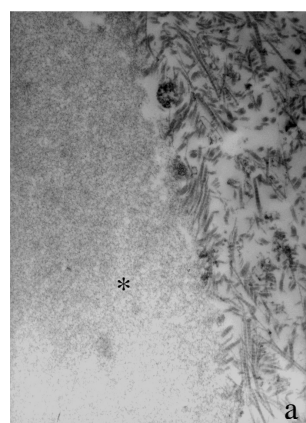


Abb. 25 Höhere Vergrößerung als Abb 24. Zu beachten, die Orientierung der Kollagenfasern in Richtung des Implantats und die Verbindung mit dem Implantat, a 11500x, b 39000x \* - Spongostan®

## 6.2 Das Verhalten der Chondrozyten in der Zellkultur

### 6.2.1 Die Zellverteilung

In frischem hyalinem Knorpel lagen die Knorpelzellen in einem homogenen Zellverteilungsmuster vor (Abb. 26 und 27)

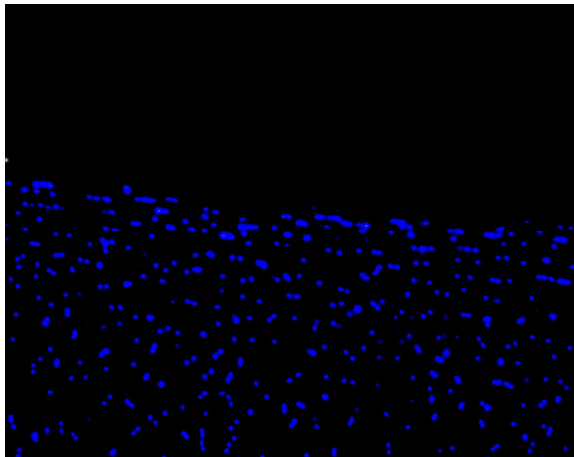


Abb. 26 Zellverteilung im frischen Knorpel an der Oberfläche, DAPI, 10x

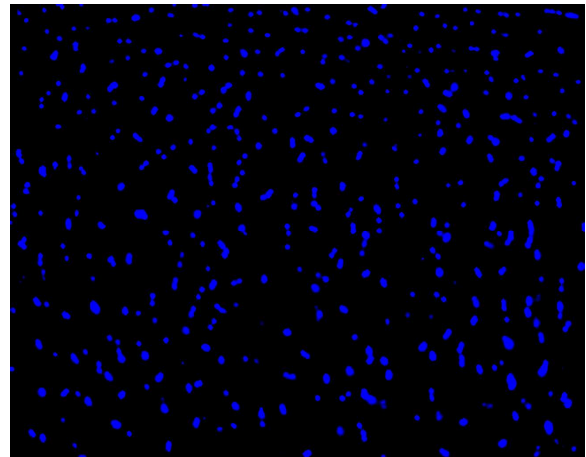


Abb. 27 Zellverteilung in der mittleren Zone des frischen Knorpels, DAPI, 10x

Auch in den Spongostanimplantaten konnte eine homogene Verteilung der Zellen erzielt werden. Auf bestimmte Regionen beschränkte Clusterbildungen, beispielsweise eine Zellansammlung nur an der Oberfläche oder dem Boden des Implantats, konnte nicht beobachtet werden. Zudem hielten die Zellen während der gesamten Kultivationsphase ihre homogene, dreidimensionale Verteilung (Abb. 28).

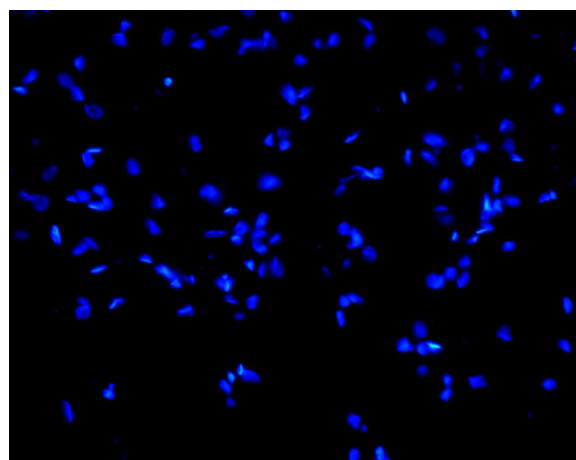


Abb. 28 Zellverteilung im Spongostanimplantat nach 3 Wochen Kultur, DAPI, 20x

Demgegenüber war in den Knorpel-Knochen-Explantaten zu beobachten, dass es zu Clusterbildungen über dem subchondralem Knochen und an der Oberfläche des Knorpels kam. In der mittleren Zone wurde eine, im Vergleich zum frischen Knorpel, relative Zellverarmung nach der Kultivation sichtbar (Abb. 29 und 30).

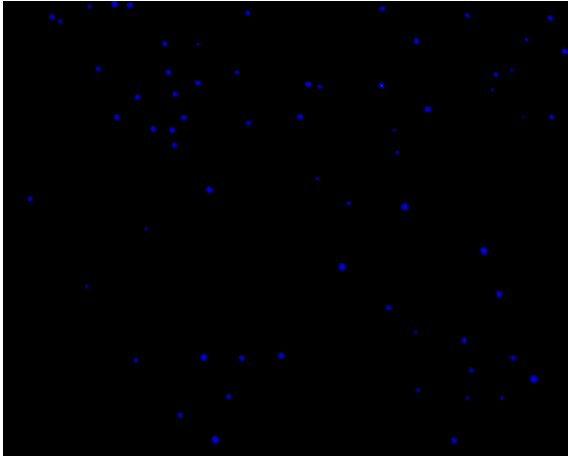


Abb. 29 Relative Zellverarmung, im Vergleich zu (Abb. 27), in der mittleren Zone des Knorpels des Knorpel-Knochen-Stücks nach Kultur, DAPI, 10x

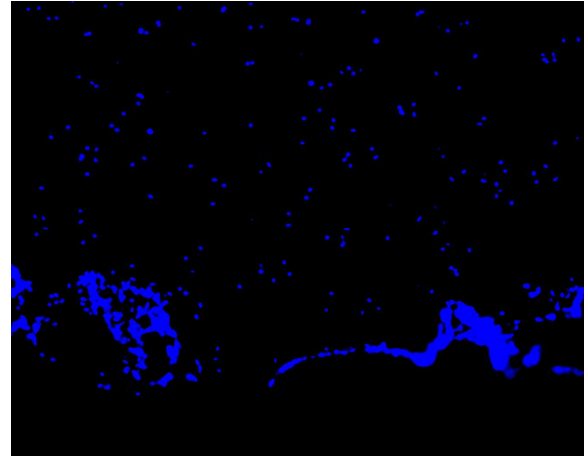


Abb. 30 Clusterbildung über dem subchondralen Knochen nach 3 Wochen Kultur, DAPI, 10x

### 6.2.2 Strukturelle Feindiagnostik der Chondrozyten im Spongostanimplantat

Die Untersuchungen der Feinstruktur der Chondrozyten im Spongostanimplantat ergaben, dass die Chondrozyten in dem Spongostanimplantat von einer Kollagenschicht umgeben waren. Hierbei handelte es sich mit Hinblick auf die Ergebnisse der Immunhistologie (siehe Kapitel 6.3.4) am wahrscheinlichsten um Kollagen-Typ VI.

Des Weiteren war zu erkennen, dass sich die Chondrozyten in einem sehr vitalen und stoffwechselaktiven Zustand befanden, was zum einen durch die reichlich im Zytoplasma nachweisbaren Matrixvesikel verdeutlicht wird sowie zum anderen durch den Nachweis aktiver Transportvorgänge im Bereich der Zell- und Kernmembran zu erkennen war.

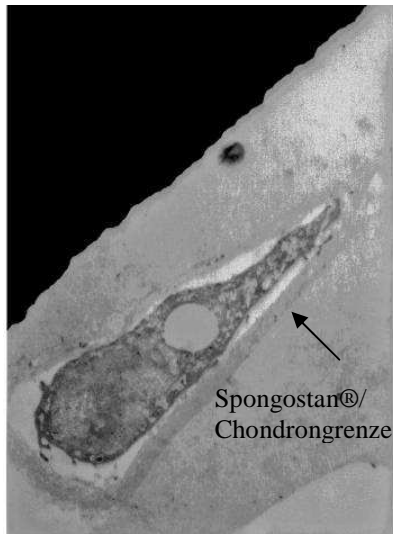


Abb. 31 Chondrozyt im Spongostan®. Zu beachten, Umgebung des Chondrozyten aus Kollagen, EM 5500x

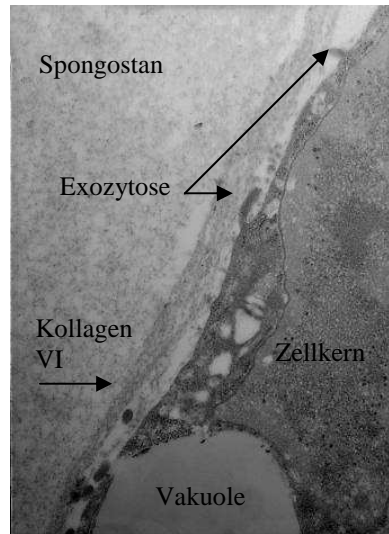


Abb. 32 Detailaufnahme der Spongostan®-Chondrongrenze, EM 15 500x

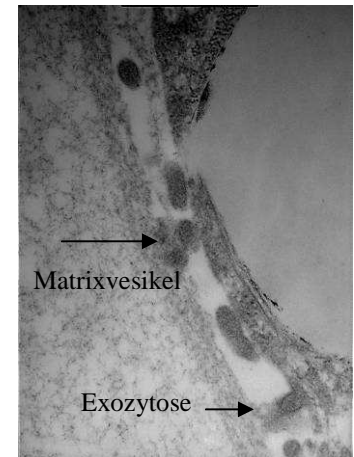


Abb. 33 Perizellulär abgegebene Matrixvesikeln eines Chondrozyten im Spongostan®, lassen auf Vitalität und Stoffwechselaktivität der Zelle schließen, EM 39 000x

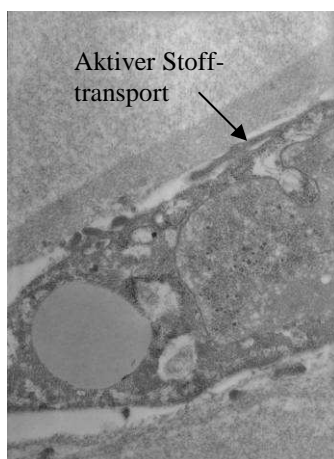


Abb. 34 Zellausschnitt eines Chondrozyten im Spongostan®. Zu sehen, aktiver Stofftransportprozess über die Zellkernmembran, EM 15500x

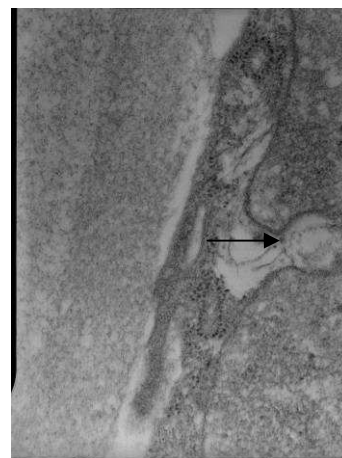


Abb. 35 Detailaufnahme aus Abb. 33, Transportprozess über die Zellkernmembran, Raues endoplasmatisches Retikulum um den Zellkern, EM 39000x



### 6.2.3 Dedifferenzierungsverhalten der Chondrozyten

Weiterhin war von Interesse, ob die Chondrozyten in der Lage sein würden, ihren chondroiden Phänotyp im Implantatmaterial zu konservieren oder, ob es zu einer Dedifferenzierung der Zellen kommen würde, wie dies in Monolayerkulturen geschieht (Benya PD 1982).

Die Chondrozyten zeigten in den Implantaten auch nach drei Wochen Kultur weiterhin ihre chondroide Morphologie. Darüber hinaus konnte eine beginnende Organisation der Zellen beobachtet werden, die sich entlang des spongiösen Maschenwerks erstreckte.

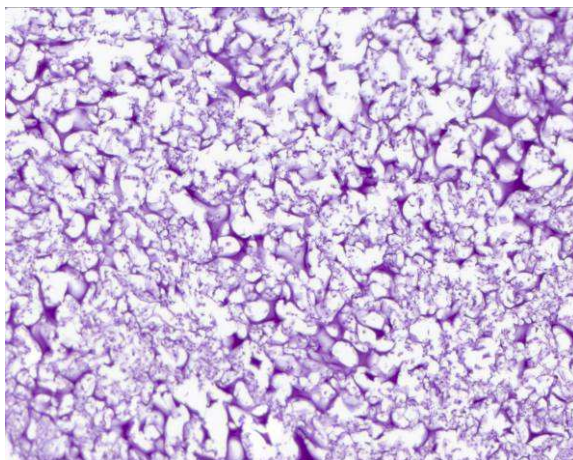


Abb. 36 Übersichtsaufnahme aus einem Spongostan-implantat. Entlang des spongiösen Maschenwerks ist die beginnende Organisation der Chondrozyten gut erkennbar. Auch die homogene Zellverteilung wird deutlich, H&E, 10x.

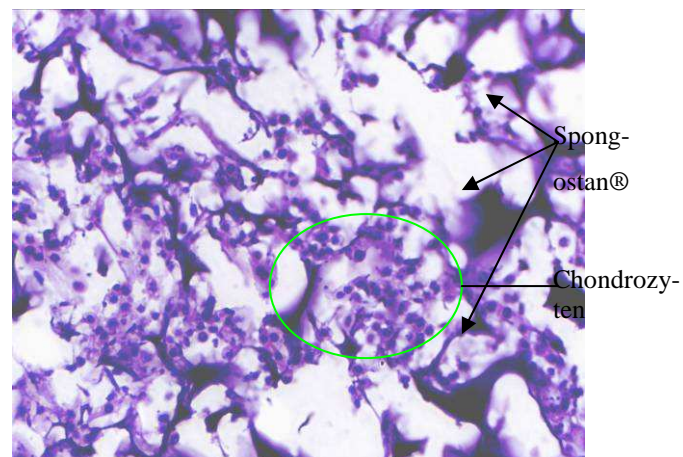


Abb. 37 Detailaufnahme aus einem Spongostanimplantat (aus Abb. 36). Die Zellen präsentieren deutlich eine chondroide Morphologie, H&E, 40x.

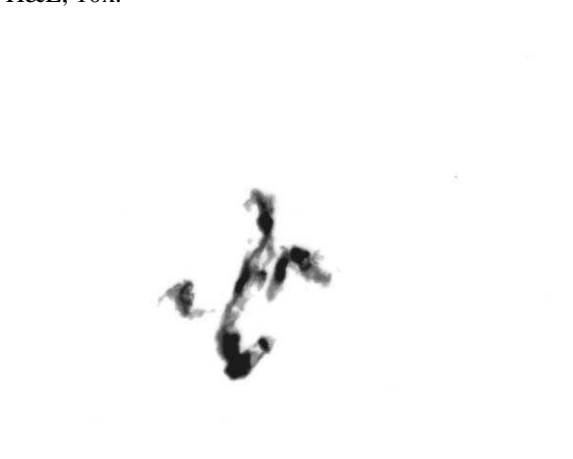


Abb. 38 MR-Aufnahme, 40x Dedifferenzierte Chondrozyten aus den Monolayerkulturen. Zu erkennen sind die lang gestreckten Zellkerne und die filiformen Ausziehungen der Zellen.

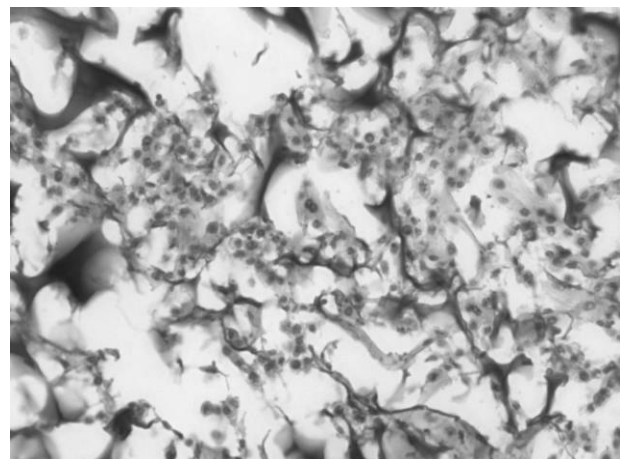


Abb. 39 MR-Aufnahme, 40x. Detailaufnahme aus dem Spongostanimplantat: Vergleich des chondroiden Habitus zu dem der dedifferenzierten Chondrozyten des nebenstehenden Bildes.

### 6.2.3.1 Dedifferenzierungsmarker auf mRNA-Ebene

Das Verhältnis von exprimierten Kollagen-Typ I zu Kollagen-Typ II oder dessen Kehrwert gilt in Bezug auf das mRNA-Expressionsverhalten in der Literatur als ein anerkannter Marker für die Dedifferenzierung von Chondrozyten (Darling EM 2005).

Daher erfolgt nun die Darstellung dieses Verhältnisses. Wie zu erwarten war, zeigten die Zellen aus dem frischen Gewebe und insbesondere die Zellen aus dem Verdau den niedrigsten Quotienten. Bemerkenswert ist hierbei allerdings, dass die Zellen aus dem Verdau einen Quotienten aufwiesen, der ca. um den Faktor 40 unter dem der Zellen aus dem unverdauten Knorpel lag.

In allen Kultursystemen konnte im Vergleich hierzu ein deutlicher Anstieg des Quotienten beobachtet werden. In der Knorpel-Knochen-Kultur lag der Quotient ca. um den Faktor 500, in den Monolayerkulturen ca. um den Faktor 120 und in der Spongostankultur sogar ca. um den Faktor 1600 über dem des unverdauten Knorpels.

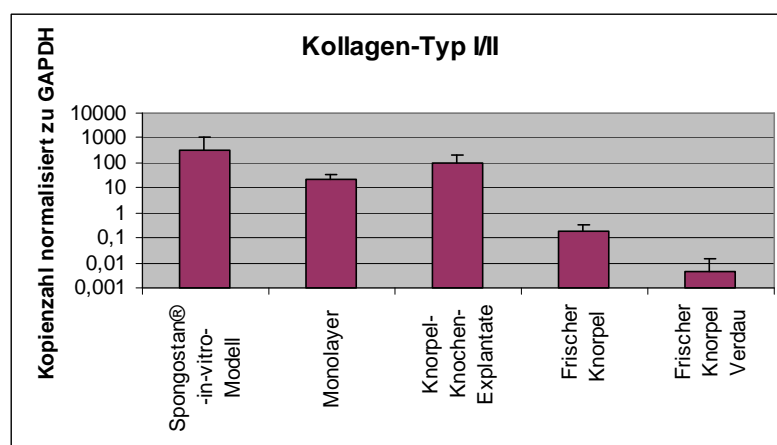


Abb. 40 Verhältnis der Kollagen I zu Kollagen II mRNA-Expression

### 6.2.3.2 Der Transkriptionsfaktor SOX-9

SOX-9 war sowohl in frischem hyalinem Knorpel als auch in Knorpel aus der Knorpel-Knochen Kultur nachweisbar (Abb. 41 und 42).

Auch in den Chondrozyten konnte die Expression von SOX-9 nachgewiesen werden (Abb. 43). Der Transkriptionsfaktor fand sich hier v.a. intranukleär (Abb. 44).

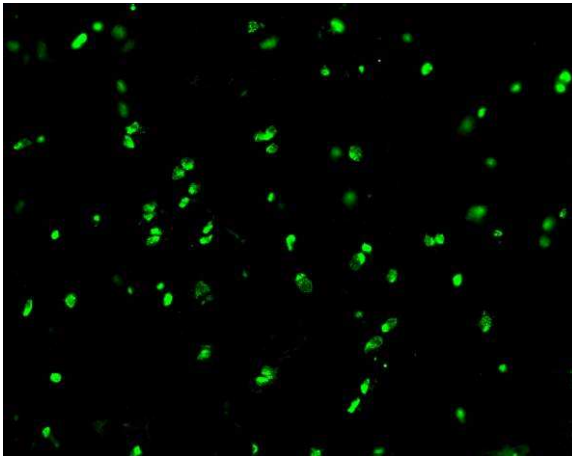


Abb. 41 SOX-9-Expression in frischem hyalinem Knorpel. Zu beachten die typische paarweise Anordnung der Chondrozyten, SOX-9 kam hier v.a. intranukleär zur Darstellung, Immunhistologie, 20x

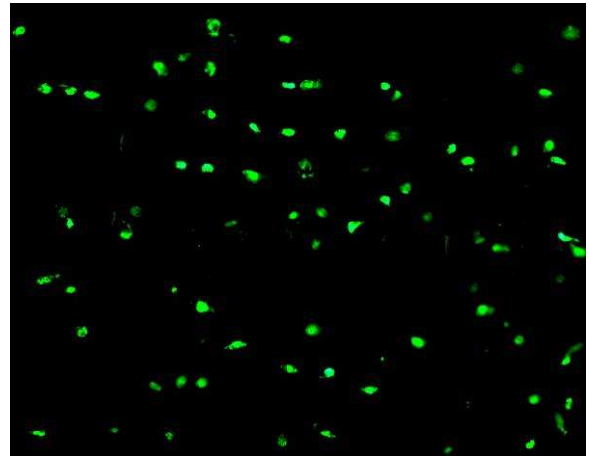


Abb. 42: SOX-9-Expression in einem Knorpel-Knochen-Explantat. Zu beachten, der Verlust der Anordnung zu Paaren, SOX-9 war v.a. intranukleär lokalisiert, Immunhistologie, 20x

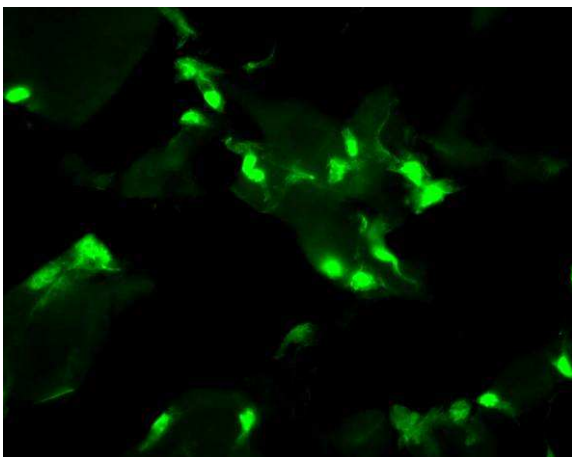


Abb. 43: SOX-9-Expression der Chondrozyten im Spongostan®, im Hintergrund die Autofluoreszenz des Spongostans® 40x

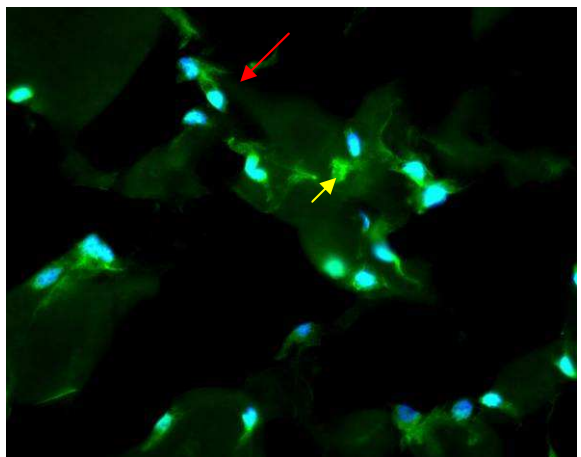


Abb. 44: Darstellung der vorwiegend intranukleären Lage (roter Pfeil) und teilweisen extranukleären Lage (gelber Pfeil) des SOX-9 durch zusätzliche Darstellung der Zellkerne mit der DAPI-Färbung, Immunhistologie, 40x

Bei der Auswertung der mRNA-Expressionshöhe des SOX-9 war auffällig, dass die Chondrozyten aus dem Knorpelverdau mit Abstand das höchste Expressionsniveau aufwiesen. Im Vergleich zu dem frischen, unverdauten Knorpel war das Expressionsniveau ca. 2700-mal höher.

Die Chondrozyten aus dem Spongostanimplantat hatten demgegenüber wiederum ein nur halb so hohes Expressionsniveau wie die Chondrozyten aus dem frischen, unverdauten Knorpel. Im Vergleich zu den Chondrozyten aus der Monolayerzellkultur war das Expressionsniveau in den Chondrozyten aus dem Spongostanimplantaten allerdings 16-mal höher und im Vergleich zu den Chondrozyten aus der Knorpel-Knochen-Kultur 10-mal höher.

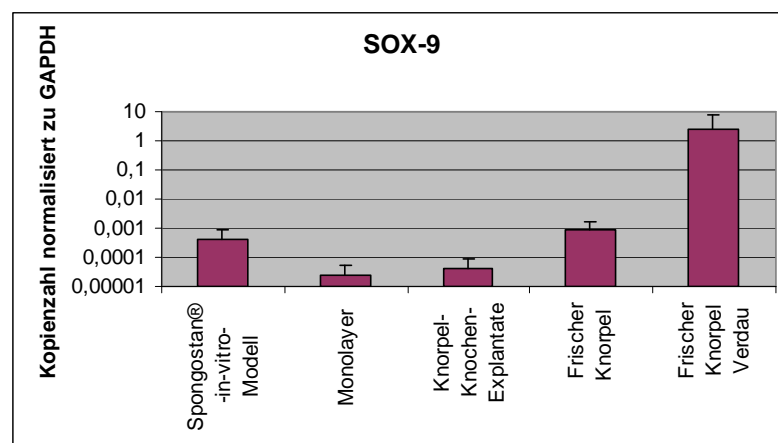


Abb. 45: mRNA-Expression des SOX-9

#### 6.2.4 Untersuchungen auf inflammatorische Reaktionen der Chondrozyten

Da bekannt ist, dass bestimmte Kollagenpeptide katabol und pro-inflammatorisch sein können (Hunziker EB 2002, Gaissmaier C 2003), wurden in allen Proben auch mRNA für Interleukin-1 (IL-1) und für VEGF mitbestimmt. Die Abb. 46 zeigt zwei mRNA-Profile



boviner Chondrozyten nach Kultivation in Spongostan. Während das obere typisch ist und keine Expression inflammatorischer Marker (IL-1a und VEGF) zeigt, wurden in der zweiten Kultur als einziger der Versuchsreihe diese Marker positiv dargestellt. Dies zeigt, dass die proinflammatorische Aktivierung unter Spongostan eher die Ausnahme als die Regel ist.

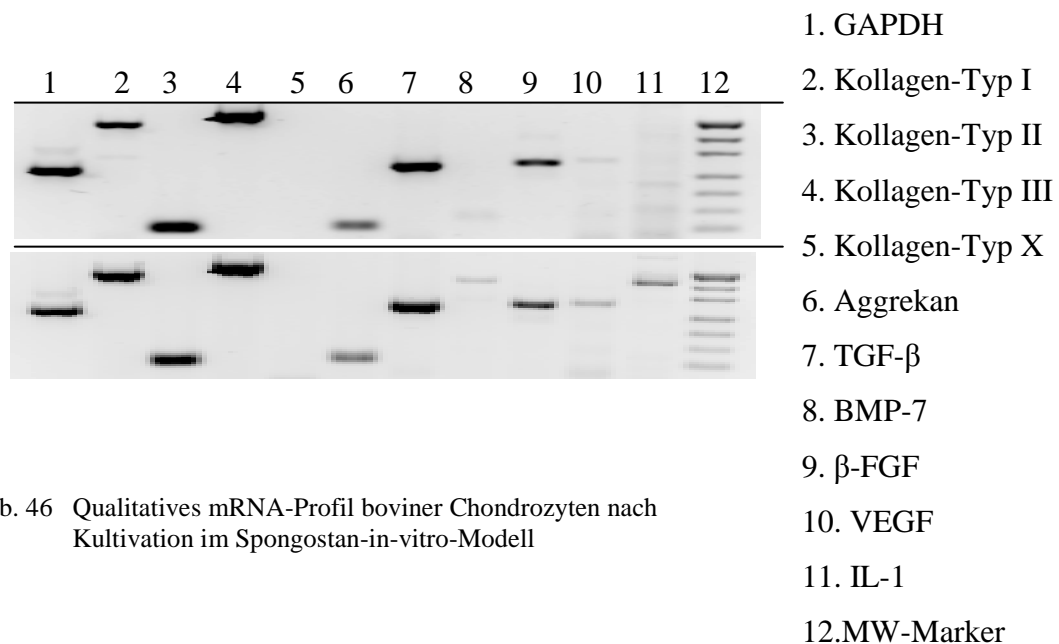


Abb. 46 Qualitatives mRNA-Profil boviner Chondrozyten nach Kultivation im Spongostan-in-vitro-Modell

### 6.3. Die Entwicklung der Extrazellulären Matrix in der Zellkultur

Als wichtige Komponenten der EZM des hyalinen Knorpels wurden das Proteoglykan Aggrekan, die Glykosaminoglykanverteilung der EZM sowie die Kollagene der Typen II, VI und X untersucht. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen bezüglich der knorpelunspezifischen Kollagene-Typ I und III.

Der Nachweis der Kollagene bzw. Proteoglykane wurde auf proteinogener Ebene mittels Immunhistologie durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden mit denen der qRT-PCR verglichen.

### 6.3.1 Aggrekan

Im frischen hyalinen Knorpel sowie in den Proben aus der Knorpel-Knochen-Kultur stellte sich Aggrekan ubiquitär verteilt dar (Abb. 47).

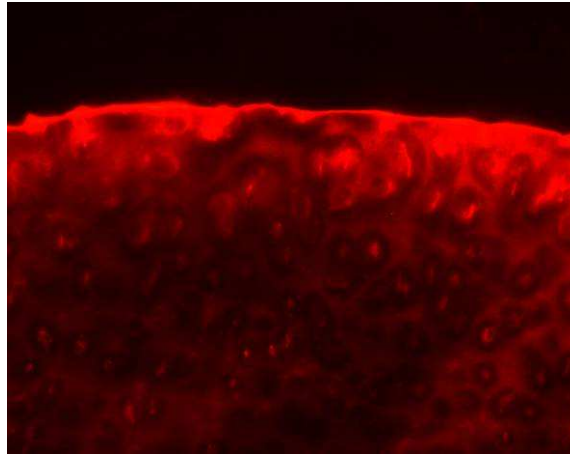


Abb. 47: Aggrekandeposition in den Knorpel-Knochen-Explantaten, Immunhistologie, 20x

Sowohl bei den Chondrozyten, die im Spongostan®, als auch bei den Chondrozyten, die als Monolayer kultiviert waren, konnte das Proteoglykan Aggrekan in unmittelbarer Umgebung der kultivierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 48 und 49). Bei den im Monolayer kultivierten Zellen gelang der Nachweis insbesondere an den Stellen, wo sich die Zellen in Clustern sammelten (Abb. 50 und 51).

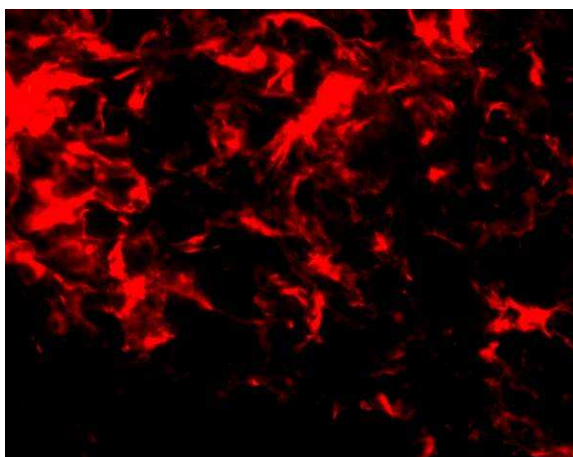


Abb. 48: Aggrekandeposition im Spongostan®, Immunhistologie, 20x

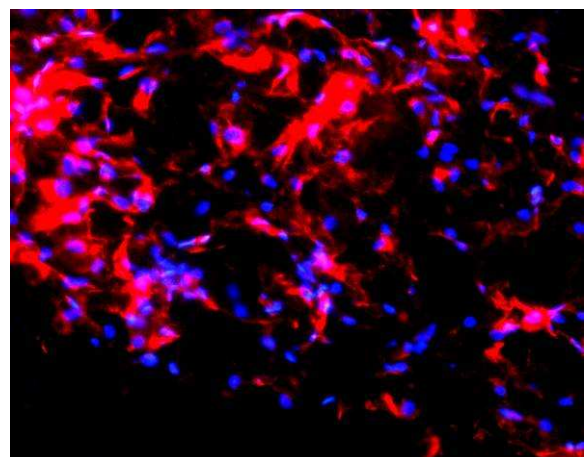


Abb. 49: Aggrekandeposition im Vergleich zur Lage der Zellen im Spongostan®, Immunhistologie, 20x

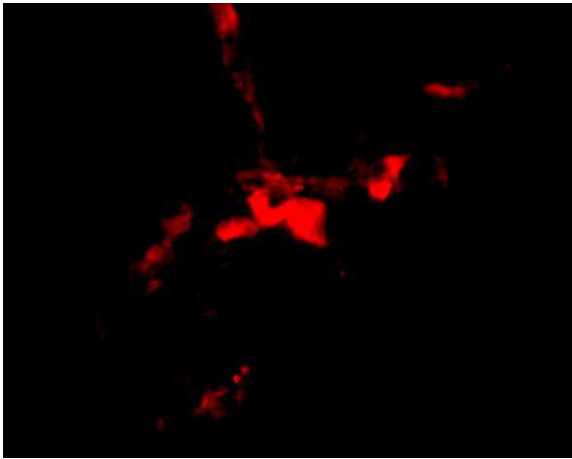


Abb. 50: Aggrecandeposition in der Umgebung von Zellen, die aus dem Monolayer gewonnen wurden Immunhistologie, 40x

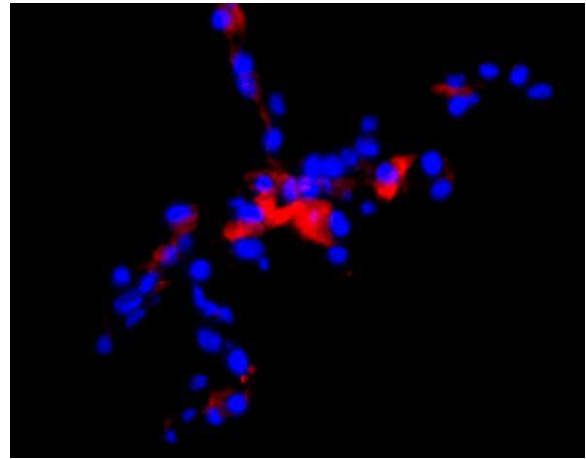


Abb 51.: Der Nachweis der Aggrecandeposition gelang bei den Monolayerzellkulturen insbesondere an Stellen, wo die Zellen dicht gepackt beieinander lagen. Vergleiche Bildmitte mit den äußeren Bereichen. 40x

Beim Vergleich der Kultursysteme mit dem frischen, unverdauten sowie dem verdauten Knorpel fiel auf, dass bei jeglicher Kultivation von Chondrozyten das mRNA-Expressionsniveau gesunken war. Hierbei konnte auch beobachtet werden, dass die Zellen, die aus dem Verdau des Knorpels hervorgingen, ein höheres Expressionsniveau hatten als die Zellen, die sich in dem unverdautem Knorpel befanden. Werden die Kultursysteme untereinander verglichen, fällt auf, dass die Zellen im Spongostan® das niedrigste mRNA-Expressionsniveau für Aggrecan besaßen. Es war im Vergleich zu den Monolayerkulturen ca. 30-mal, im Vergleich zu den Knorpel-Knochen-Explantaten ca. 20-mal und im Vergleich zu frisch gewonnenem unverdautem Knorpel sogar ca. 100-mal niedriger. Die Monolayerkulturen wiederum hatten ein ca. 8-mal geringeres Expressionsniveau als Chondrozyten, die aus dem frischem Verdau hervorgehen. Im Vergleich zu den Knorpel-Knochen-Explantaten war das Expressionsniveau doppelt so hoch.

Auch in den Knorpel-Knochen-Explantaten konnte im Vergleich zu frischem, unverdautem Knorpel ein deutliches Absinken des Expressionsniveaus registriert werden. Dieses war ca. 5-mal niedriger als das des frischen unverdauten Knorpels.

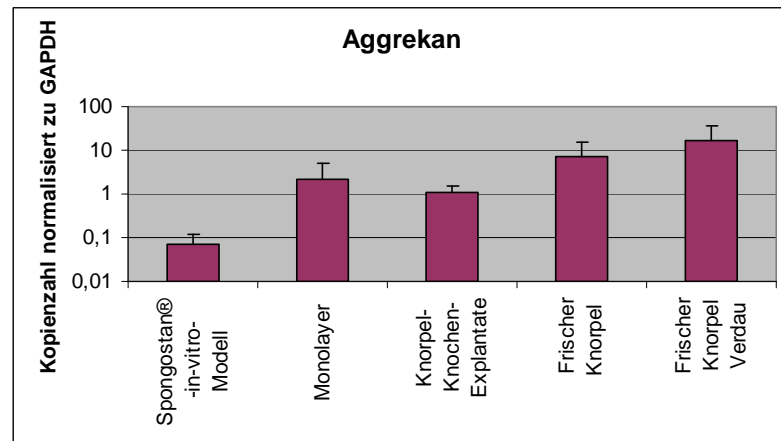


Abb. 52 Aggrekan-mRNA-Expression

### 6.3.2 Glykosaminoglykane

Der Nachweis über die Verteilung der Glykosaminoglykane erfolgte mit der Alcianblaufärbung. Die Zellkerne wurden mit Kernechtrot zur Darstellung gebracht.

Frischer Knorpel präsentiert in dieser Färbemethode eine tief blaue Farbe, was einen entsprechend hohen Gehalt an Glykosaminoglykane widerspiegelt. In den Knorpel-Knochen-Explantaten zeigte der Knorpel eine ähnlich intensive Blaufärbung (Abb. 53), auch wenn sich die Mittelzone weniger intensiv anzufärben schien.

In den Spongostanimplantaten (Abb. 54-55) stellten sich insbesondere die Randbereiche zum Knorpel hin in einem intensiv blauen Farbton dar. Im Inneren des Implantates konnte nur eine schwache Blaufärbung nachgewiesen werden, die sich auch nicht in allen Bereichen des Implantats manifestierte. In den Monolayerzellkulturen gelang die Färbung der Glykosaminoglykane nicht.

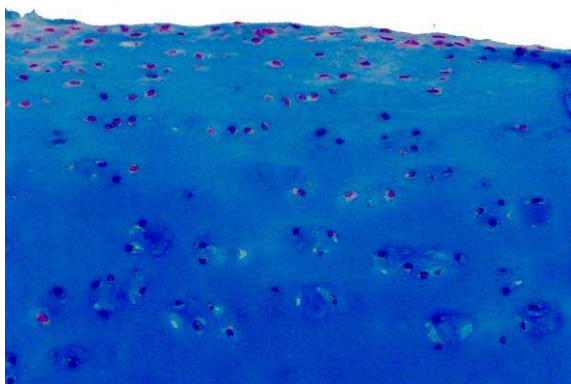


Abb. 53 Knorpel-Knochen-Explantat, Alcianblau, 20x

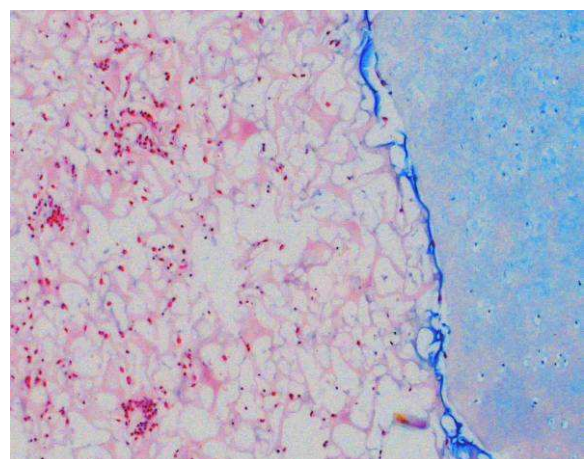


Abb. 54: Übergangsbereich des Implantats zum Knorpel. Intensiv gefärbter Übergangsbereich Randknorpel/Implantat, Alcianblau, 20x

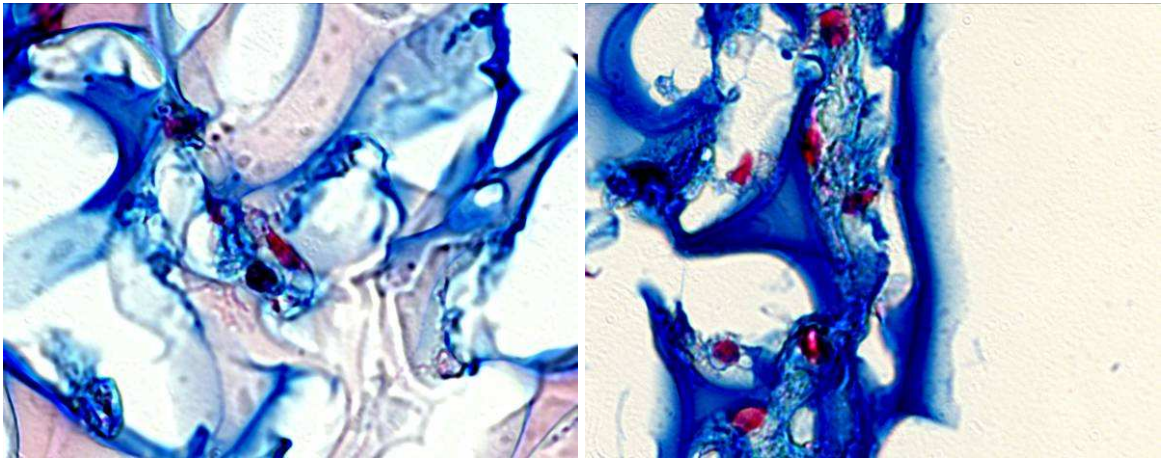


Abb. 55: Detailaufnahmen aus dem Randbereich zwischen Implantat und Knorpel, Alcianblau, 100x

### 6.3.3 Kollagen-Typ II

Kollagen-Typ II, das wichtigste Kollagen des hyalinen Knorpels (Gelse K 2003, Eyre DR 2006), stellt sich in frischem Gelenkknorpel in ubiquitärer Verteilung dar (Abb. 56). Dies konnte auch für die Knorpel-Knochen-Kultur nachgewiesen werden. Dabei zeigten allerdings sowohl die superfiziellen Zellschichten als auch die Bereiche über dem subchondralen Knochen im Vergleich zur Mittelzone eine intensivere Färbung (Abb. 57).

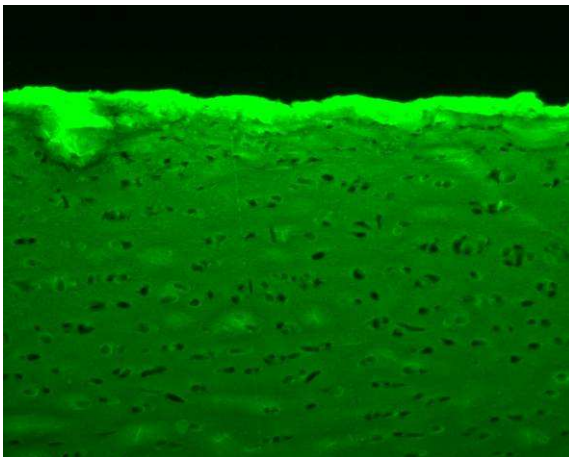


Abb. 56: Ubiquitäre Verteilung des Kollagen-Typs II in frischem Knorpel, Immunhistologie, 10x

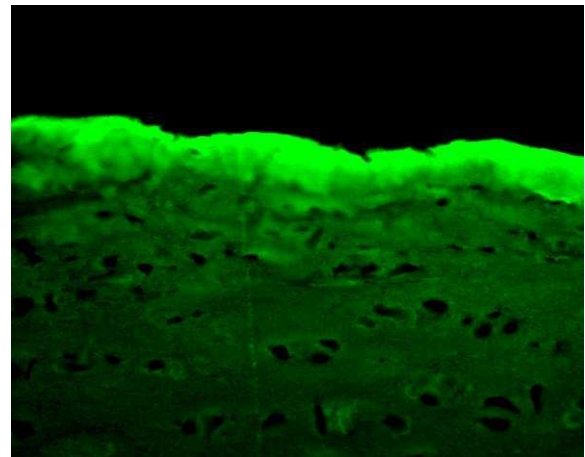


Abb. 57: Auch im Knorpel der Knorpel-Knochen-Explantaten war Kollagen-Typ II noch ubiquitär nachweisbar, jedoch bevorzugt an der Oberfläche. Immunhistologie, 20x



In den Spongostanimplantaten konnte eine intensive Kollagen-Typ-II-Expression nachgewiesen werden (Abb. 58 und 59).

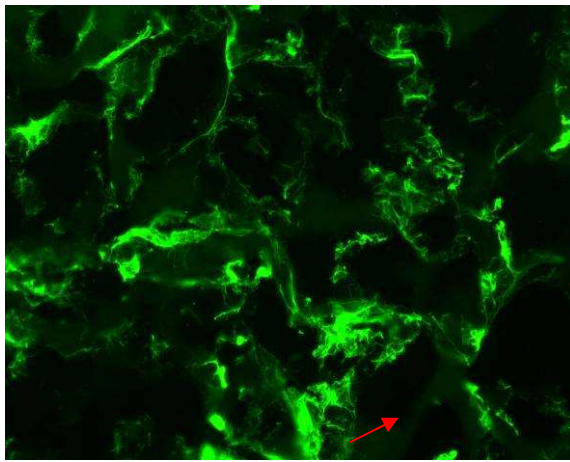


Abb. 58: Kollagen-Typ-II-Expression aus dem Inneren eines Spongostanimplantats. Zu beachten, im Hintergrund die Autofluoreszenz des Spongostans (Pfeil), 20x

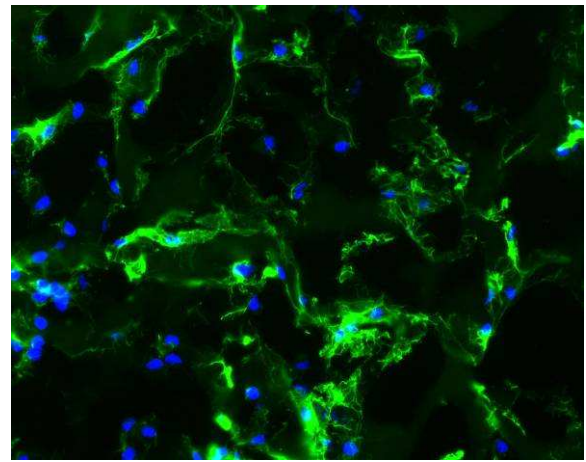


Abb. 59: Kollagen-Typ-II-Deposition im Vergleich zur zellulären Lage der Chondrozyten, Immunhistologie, 20x

Vereinzelt gelang die immunhistologische Darstellung von Kollagen-Typ II in den Monolayerzellkulturen. Ähnlich wie bei der Aggrekan-Expression, fand sich Kollagen-Typ II bevorzugt an Stellen, wo es zu einer dichten Zusammenlagerung von Zellen gekommen war (Abb. 60 und 61).

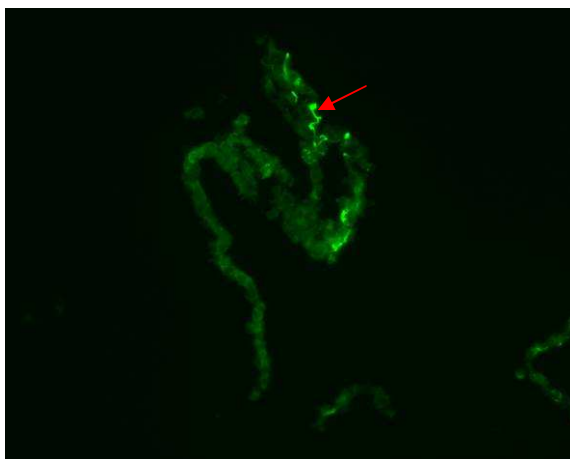


Abb. 60: Im Monolayer scheinen nicht alle Zellen Kollagen-Typ II zu exprimieren (Pfeil weist auf positiven Bereich). Zu beachten, dass dies am ehesten Zellen aus dicht gepackten Zellbezirken sind. Immunhistologie, 20x

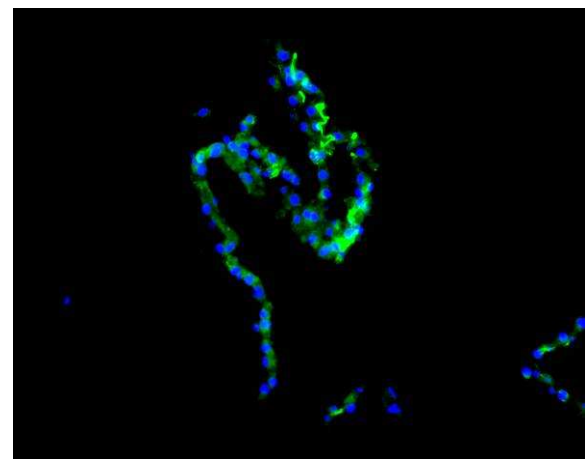


Abb. 61: Kollagen-Typ-II-Expression im Vergleich zur zellulären Lage, Immunhistologie, 20x

Auch in der mRNA-Expression des Kollagen-Typs II ist bei allen Kultursystemen im Vergleich zu frischem hyalinem Knorpel und zu Chondrozyten, die aus einem Verdau von Knorpel stammen, ein starker Abfall des Expressionsniveaus zu verzeichnen.

Chondrozyten, die in Spongostan® kultiviert wurden, wiesen das niedrigste Expressionsniveau auf. Dabei konnte im Vergleich zu den Knorpel-Knochen-Explantaten ein Expressionsrückgang um ca. die Hälfte verzeichnet werden. Dieser Rückgang ist, verglichen mit dem bei der Aggrekan-Expression, als nicht ganz so ausgeprägt zu bewerten.

Im Vergleich zu den Monolayerkulturen war das Expressionsniveau ca. 10-mal geringer. Die Chondrozyten aus der Monolayerkultur hatten wiederum ein ca. 60-fach niedrigeres Expressionsprofil als die Chondrozyten, die aus dem Knorpelverdau stammten.

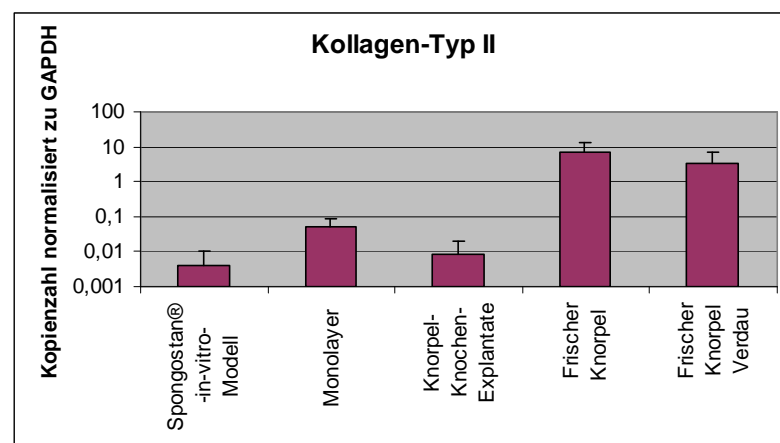


Abb. 62 mRNA-Expressionsniveau des Kollagens-Typ-II

#### 6.3.4 Kollagen-Typ VI

In hyalinem Knorpel lagert sich das Kollagen-Typ VI um die Chondrone und bildet eine schmale Schicht an der Oberfläche in der Superfizialschicht des hyalinen Knorpels (Abb.63).

Kollagen-Typ VI war in den Knorpel-Knochen-Explantaten in allen Zellschichten nachweisbar. Es war sowohl in der Superfizialschicht als auch über dem subchondralen Knochen bevorzugt darstellbar (Abb. 64 und 65). Weiterhin fiel auf, dass in vielen Chondronen noch Kollagen VI nachweisbar war. In der DAPI- Färbung ließen sich darin aber kei-

ne Zellkerne darstellen (Abb. 64). Es kann darum davon ausgegangen werden, dass es sich um Kollagen-Typ VI handelt, das vor der Kultivation abgelagert wurde.

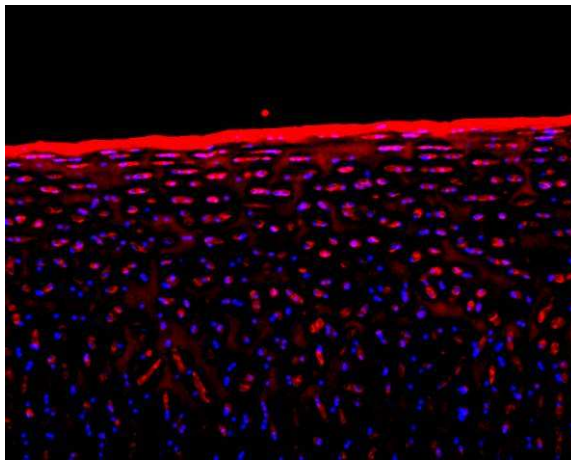


Abb. 63: Lokalisation des Kollagens-Typ VI in frischem hyalinen Knorpel. Jedem der Kollagen VI positiv dargestellten Chondrone können auch ein bis teilweise drei Zellkerne zugewiesen werden, 10x

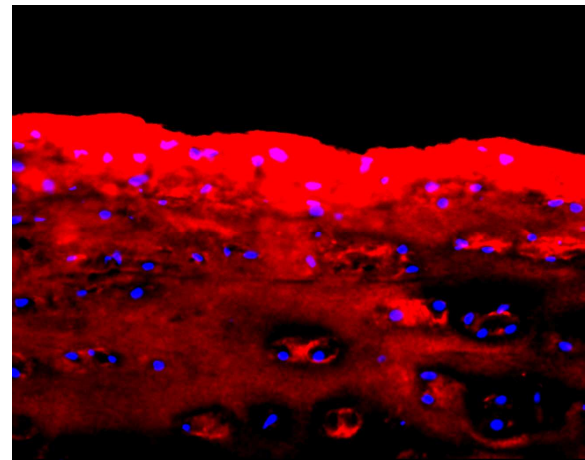


Abb. 64: Kollagen-Typ-VI-Deposition in der Superfizialschicht der Knorpel-Knochen-Explantate, Immunhistologie, 20x

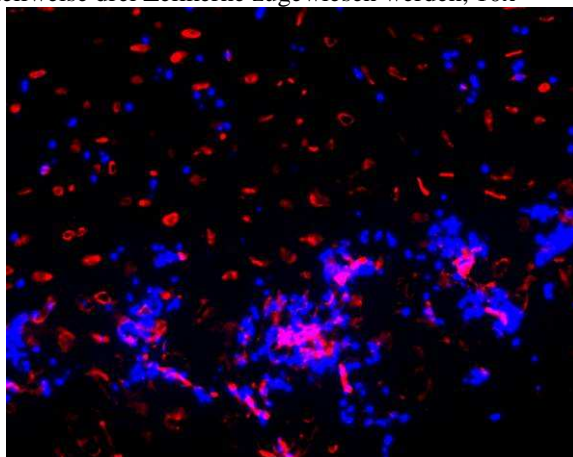


Abb. 65: Kollagen-Typ-VI-Deposition über dem subchondralen Knochen. Zu beachten, die Clusterbildung der Zellen zum einen und die häufig leeren Chondrone in den höheren Zellschichten zum anderen, Immunhistologie, 10x

In den Spongostanimplantaten präsentierte sich in der Immunhistologie ein hohes Maß an Kollagen-Typ-VI-Expression (Abb. 66 und 67). Es konnte in unmittelbarer Umgebung aller Zellen nachgewiesen werden. Dabei war in einigen Fällen sogar ansatzweise zu beobachten, wie sich das Kollagen, vergleichbar dem adulten Knorpel, um die Zellen lagerte (Abb. 67).

Auch in den Monolayerkulturen ließ sich Kollagen-Typ VI nachweisen. Dessen Expression war eher schwach ausgeprägt und v.a. auf die Bereiche mit vielen Zellen beschränkt. Ähnlich wie es bereits für die Kollagen-Typ-II-Expression beschrieben wurde, kam es auch hier zur Zusammenlagerung von Chondrozyten (Abb. 68).



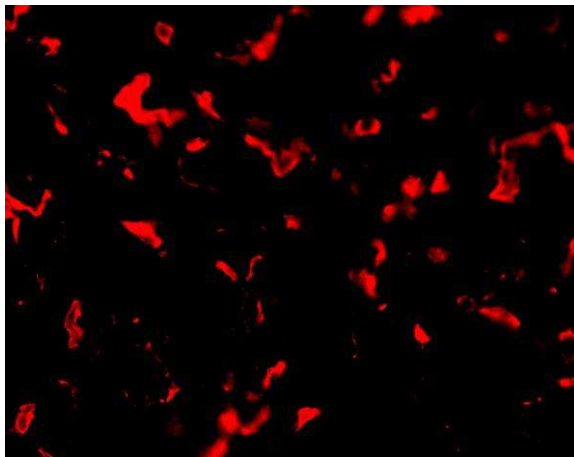


Abb. 66: Kollagen-Typ-VI-Deposition im Spongostan, Immunhistologie, 20x

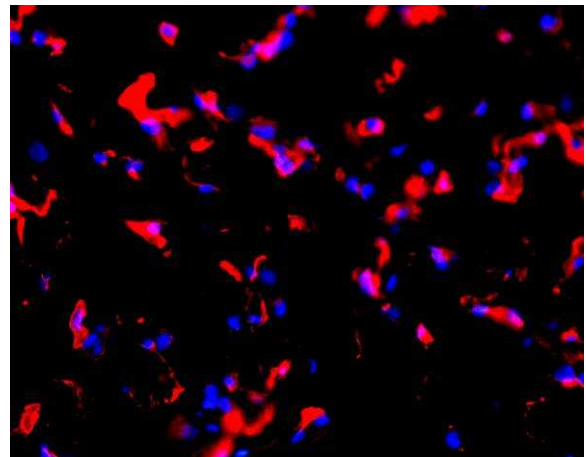


Abb. 67: Lokalisation des Kollagen-Typs VI in Bezug auf die zelluläre Lage. Zu beachten ist, wie sich das Kollagen-Typ VI um die Zellen herum lagert. Immunhistologie, 20x

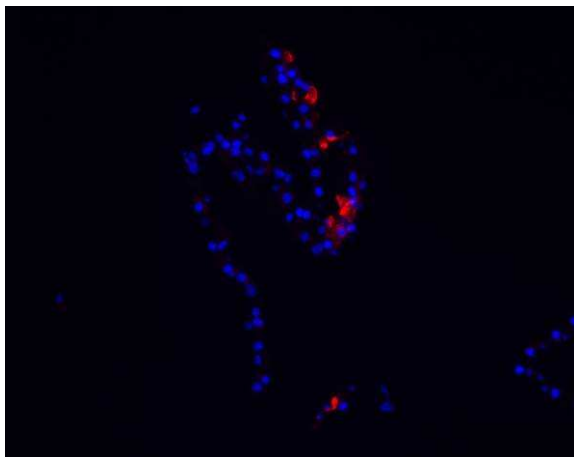


Abb. 68: Kollagen-Typ-VI-Expression im Monolayer. Die Kollagen-Typ VI wird nur spärlich und dann im Bereich von Zellzusammenlagerung expremiert. Immunhistologie, 20x

Der Nachweis von Kollagen-Typ-VI-mRNA gelang nur in den Knorpel-Knochen-Explantaten und in den Spongostanimplantaten.

Bei der Untersuchung des frischen Knorpels, der aus dem Verdau entnommenen Chondrozyten und bei den Monolayerkulturen erbrachte die Analyse der DNA-Schmelzkurven, dass sich in diesen Proben keine Kollagen- Typ VI-mRNA befand.

Das Expressionsverhalten befand sich auch diesmal bei den Chondrozyten aus den Spongostanimplantaten auf einem niedrigeren Niveau als in den Knorpel-Knochen-Explantaten. Es lag ca. um den Faktor 6 unter dem der Chondrozyten aus den Knorpel-Knochen-Explantaten.

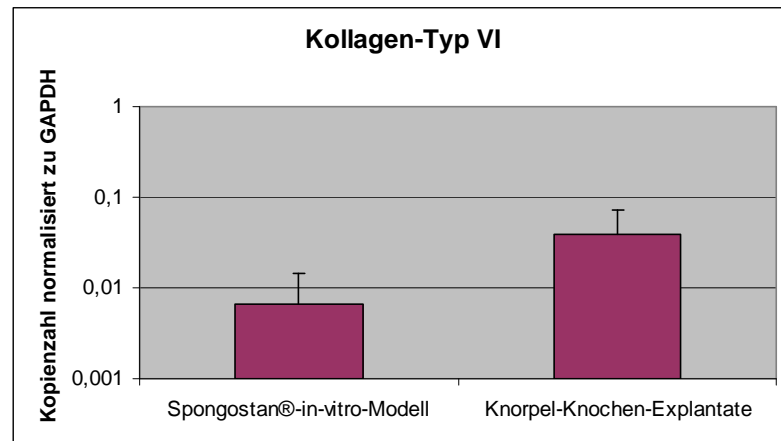


Abb. 69 mRNA-Expressionsniveau Kollagen -Typ VI

### 6.3.5 Kollagen-Typ X

Kollagen-Typ X stellte sich bei frischem Knorpel in der Verbindungszone im Bereich des sich kalzifizierenden Knorpels zwischen Knorpel und Knochen dar. Das Gleiche konnte auch für die kultivierten Knorpel-Knochen-Explantate festgestellt werden.

Auch in den Monolayerzellkulturen und in den Spongostanimplantaten exprimierten die Chondrozyten Kollagen-Typ X (Abb. 70 und 71).

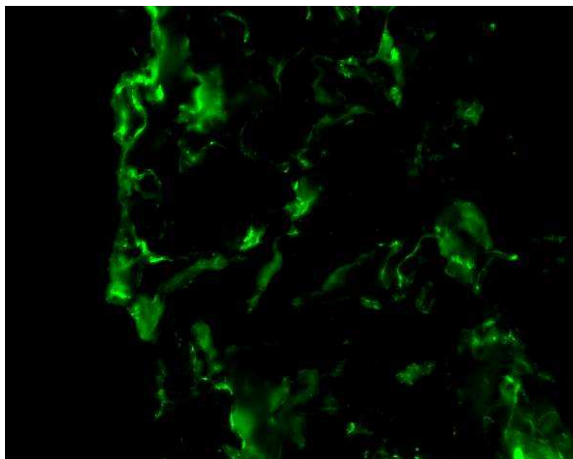


Abb. 70: Kollagen-Typ-X-Expression innerhalb des Spongostans, Immunhisologie 20x

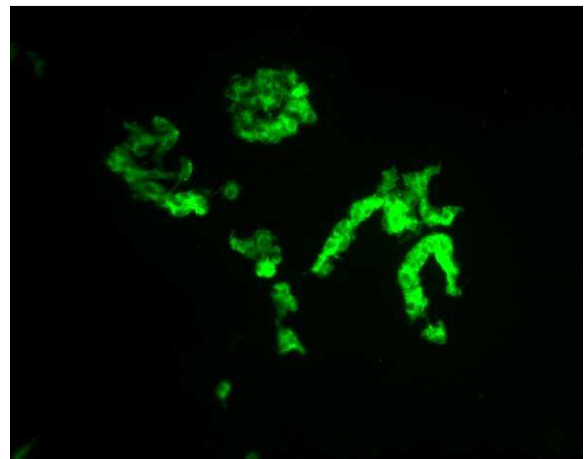


Abb. 71: Kollagen-Typ-X-Expression innerhalb der Monolayerkultur, Immunhisologie, 20x

Die Färbung war aber bei den Spongostanimplantaten nicht so intensiv, wie dies bei anderen Kollagenen, beispielsweise bei den Kollagenen-Typ II und Typ VI der Fall war. Bei

den Monolayerkulturen schien die immunhistologische Darstellbarkeit, jedoch im Vergleich zu den Kollagenen-Typen II und VI stärker ausgeprägt zu sein (Abb. 71).

Beim Vergleich des mRNA-Expressionsniveaus der verschiedenen Kultursysteme als auch des frischen Knorpels zeigten sich erhebliche Differenzen. Das Expressionsniveau war bei den Monolayerkulturen am niedrigsten. Dieses war ca. 5-mal geringer als das der in Spongostan® kultivierten Zellen. Die in Spongostan kultivierten Zellen hatten wiederum ein um ca. 860-mal geringeres Expressionsniveau als Chondrozyten aus den Knorpel-Knochen-Explantaten. Bei Chondrozyten aus den Knorpel-Knochen-Explantaten wiederum lag ein ähnlich hohes Niveau wie bei den Chondrozyten aus dem frischen unverdauten Knorpel vor. Zellen, die aus dem verdauten Knorpel stammten, wiesen ein im Vergleich zu den Knorpel-Knochen-Explantaten ca. 20-fach geringeres Expressionsniveau auf.

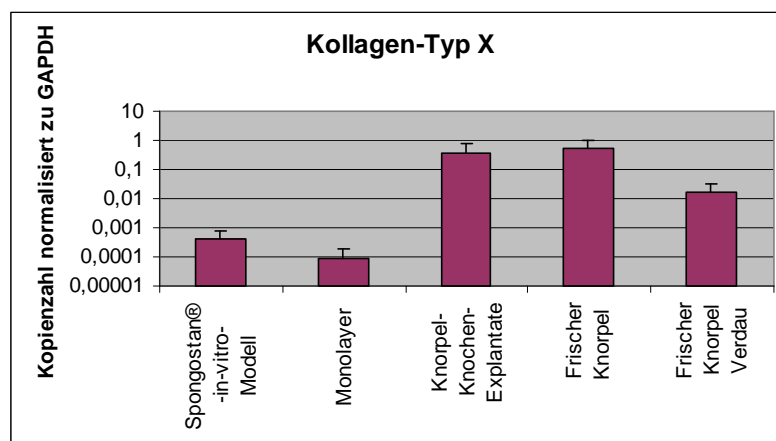


Abb 72 mRNA-Expressionsniveau Kollagen-Typ X

### 6.3.6 Kollagen-Typ I

Kollagen-Typ I bildete in der Superfizialschicht des hyalinen Knorpels einen zarten Saum (Abb. 73) und war am Übergang zwischen Knorpel und Knochen schwach nachweisbar. Während der Kultivation der Knorpel-Knochen-Explantate kam es zu einer Verbreiterung des Saums insbesondere an der Oberfläche des Knorpels (Abb. 74). Alle anderen Knorpelzonen stellten sich wie auch bei frischem Knorpel Kollagen-Typ I negativ dar.

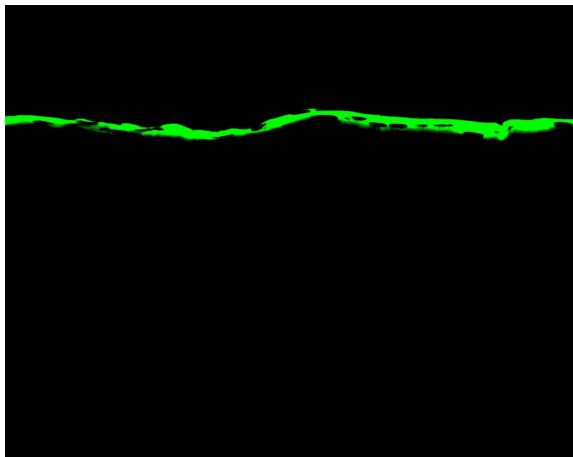


Abb. 73: Schmäler Kollagen-I-Saum an der Knorpeloberfläche des frischen Knorpels, Immunhistologie, 10x.

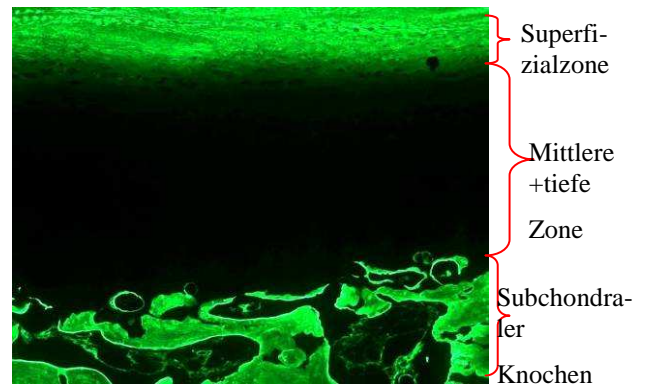


Abb. 74: Zunahme der Kollagen I Expression in den Knorpel-Knochen-Explantaten insbesondere in den superfiziellen Zelllagen, Immunhistologie, 10x.

Die Expression von Kollagen-Typ I konnte ebenfalls sowohl in den Spongostanimplantaten als auch in den Monolayerkulturen nachgewiesen werden (Abb. 75 und 76). Dabei war festzustellen, dass sich sowohl im Spongostan® als auch in den Monolayerkulturen die Expression nicht auf einzelne Zellbezirke beschränkte, sondern ubiquitär anzutreffen war.

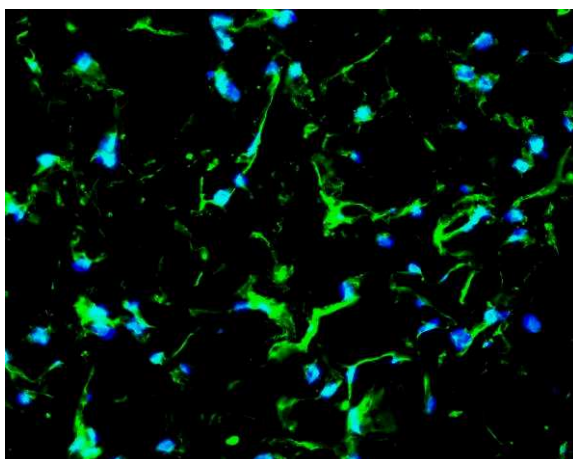


Abb. 75: Kollagen-Typ-I-Expression im Spongostanimplantat, Immunhistologie, 20x

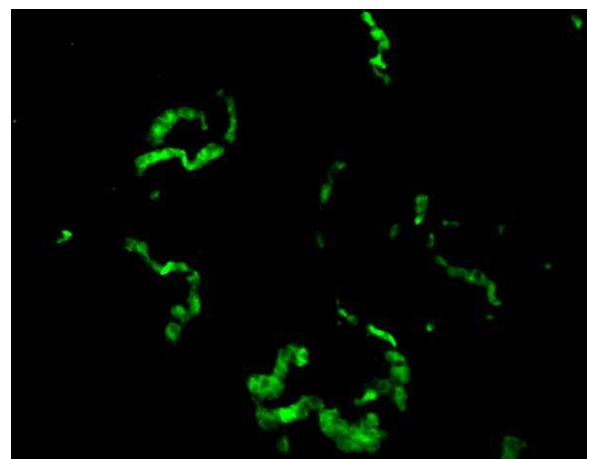


Abb. 76: Kollagen-Typ-I-Expression in der Monolayerzellkultur, Immunhistologie, 20x

Beim Vergleich der einzelnen mRNA-Expressionen kristallisierten sich zwei unterschiedliche Expressionsniveaus heraus. Einerseits verhielten sich die Chondrozyten aus dem verdauten Knorpel und aus den Spongostanimplantaten gleich. Andererseits ähnelten sich die Chondrozyten aus dem frischen verdauten Knorpel, aus den Knorpel-Knochen-

Explantaten und aus den Monolayerkulturen. Dabei war das Expressionsniveau der zuletzt genannten Gruppe ca. 15-mal höher als das der ersten Gruppe.

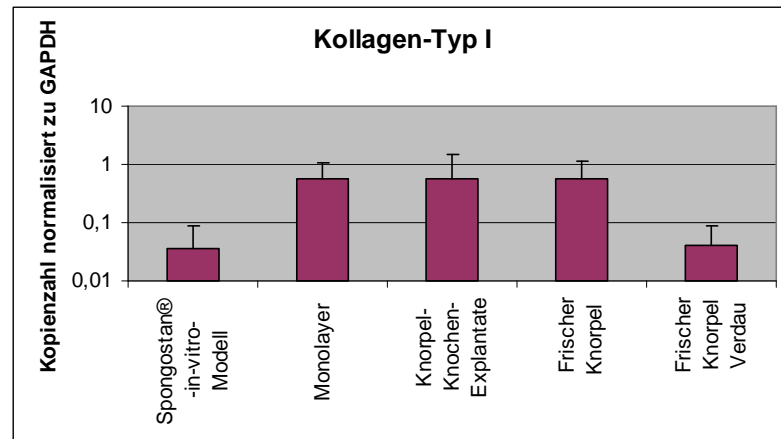


Abb. 77 mRNA-Expressionsniveau des Kollagen-Typs I

### 6.3.7 Kollagen-Typ III

Der immunhistologische Nachweis von Kollagen-Typ III konnte nur in den Spongostanimplantaten und in den Monolayerzellkulturen erbracht werden (Abb. 78-79).

Dabei wurde das Kollagen ubiquitär nachgewiesen. Die Färbung der Monolayerkulturen war intensiver als in den Spongostanimplantaten.

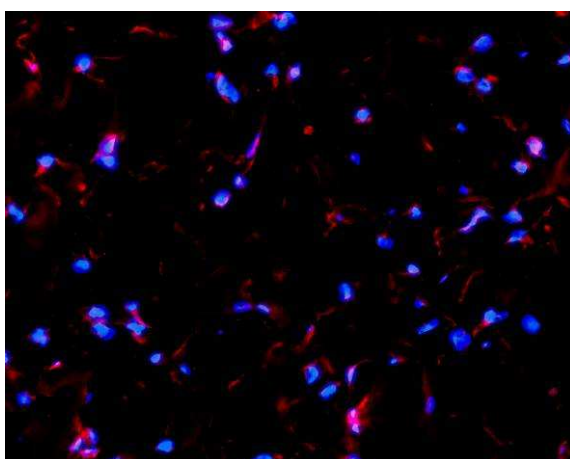


Abb. 78: Kollagen-Typ-III-Expression im Spongostanimplantat, Immunhistologie, 20x

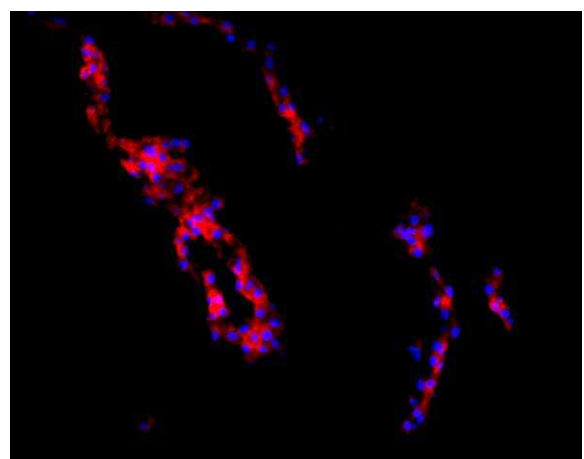


Abb. 79: Kollagen-Typ-III-Expression in der Monolayerzellkultur, Immunhistologie, 20x

Bei der Untersuchung des mRNA-Expressionsniveaus des Kollagens-Typ III war auffällig, dass mit Abstand das höchste Niveau in den Chondrozyten vorlag, die dem verdauten

Knorpel entnommen wurden. Bei allen anderen Gruppen war das Expressionsniveau deutlich niedriger. Das niedrigste Niveau lag wiederum bei den Chondrozyten aus dem Spongostan® vor. Es war ca. 7-mal niedriger als in den Monolayerkulturen, ca. 3-mal geringer als das der Chondrozyten aus den Knorpel-Knochen-Explantaten und sogar ca. 30-mal geringer als das der Chondrozyten aus dem Knorpelverdau.

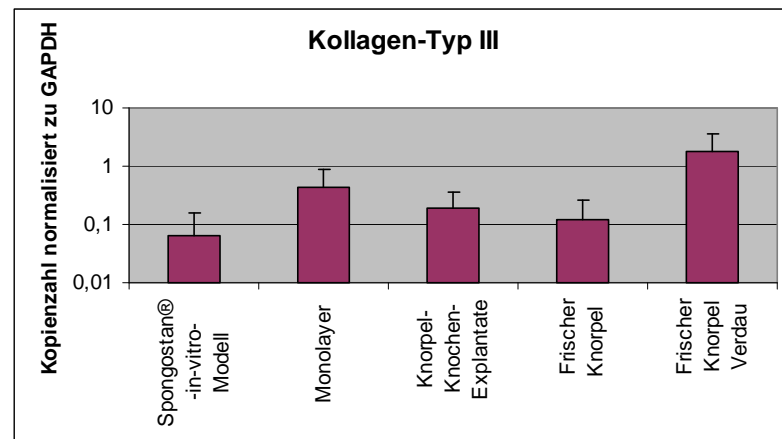


Abb. 80: mRNA-Expressionsniveau des Kollagens III

## 7. Diskussion

### 7.1 Die Problematik von Trägermaterialienstabilität und deren mangelnde Integration in Knorpeldefekte

Trägermaterialien sollen bei der Autologen-Chondrozyten-Transplantation den Zellen u.a. als ein Stützwerk und als Orientierungshilfe in der Ausrichtung innerhalb von Knorpeldefekten dienen ( Lu 2001, Tognana E 2005). Es ist daher unverzichtbar, dass verwendetes Material solange genügend Stabilität besitzt, bis die Regeneration des Knorpelimplantats vollendet ist. Idealerweise verläuft der Abbau des Materials in der gleichen Geschwindigkeit wie der Neuaufbau des Knorpels ( Sittinger M 1999, Brittberg M 2001, Lu 2001, Gaissmaier C 2003, Frenkel SR 2004).

Gerade kollagene Trägermaterialien in Form von Gelen besitzen häufig die Eigenschaft zu schrumpfen, noch bevor ein suffizienter Neoknorpel synthetisiert wurde (siehe Abb. 7). So wird es nahezu unmöglich, dass sich der Umgebungsknorpel und das Implantat verbinden können. Der Kontakt zu den Defekträndern geht somit verloren. Auf lange Sicht ist es für die biomechanische Stabilität und damit nicht zuletzt für den Erfolg der Transplantation unabdingbar, dass sich eine stabile Verbindung nicht nur zum subchondralen Knochen, sondern auch zum Umgebungsknorpel herausbildet (Coutts RD 2001, Schaefer D 2002, Frenkel SR 2004).

Im Gegensatz zu anderen kollagenen Trägermaterialien, konnte bei den Spongostanimplantaten ein Schrumpfen während der Kultivation nicht festgestellt werden.

Chondrozyten sind in der Lage, ihr Mikromilieu aktiv zu gestalten. Dabei können sie u.a. auch mit Hilfe von kontraktile Mikrofilamenten, beispielsweise alpha-smooth-muscle-actin (SMA), kontraktile Kräfte entfalten (Zaleskas JM 2004). Dies kann letztlich zum Schrumpfen von Implantaten führen. Dem wirkt das spongiöse Maschenwerk des Spongostans® besser entgegen als dies andere Trägermaterialien können. Die Stabilität der Implantate unter Kulturbedingungen ist auch eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Vorkultivation. Diese optimiert die Ergebnisse einer erfolgreichen Transplantation deutlich ( Freed LE 1995, Schaefer D 2000, Coutts RD 2001).

Die fehlende Integration von Knorpelimplantaten in den Umgebungsknorpel, ist ein anerkanntes Problem, das bei den meisten bisher bekannten Transplantationsverfahren auftritt.

Dementsprechend vielfältig sind die Versuche, eine Verbesserung der etablierten Verfahren zu erreichen oder neue Verfahren zum Verständnis und zur Lösung des Problems zu entwickeln (Hunziker EB 1998, Grande DA 1999, Lee MC 2000, Obradovic B 2001, Di Micco MA 2002, Moretti M 2005, Zhang Z 2005). Hierbei wurden Methoden entwickelt, die durch die Verdauung von Proteoglykanen der Defektränder oder durch Vorkultivation der Implantate, eine Verbesserung der Integration zu erreichen versuchten. Zudem wurden Versuchsanordnungen ausgearbeitet, die es ermöglichten, die Adhäsionskräfte der verschiedensten Implantate an der Interaktionsfläche zu messen. Zusammenfassend ist aus allen bisherigen Publikationen zu entnehmen, dass eine zufrieden stellende Integration von Transplantatknorpel bisher nur bedingt erreicht werden konnte.

Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Defektränder im Spongostan®-in-vitro-Modell konnte gezeigt werden, dass es im Umgebungsknorpel des Defekts zur Orientierung von Kollagenfasern in Richtung des Defekts gekommen war. Dies kann als ein Hinweis darauf interpretiert werden, dass es zwischen den Spongostanimplantaten und dem Knorpel zu einer aktiven Interaktion gekommen war. Gerade die Verbindung der Kollagennetzwerke des Implantats und des Umgebungsknorpels ist eine wesentliche Voraussetzung für eine gelungene Implantatintegration (Di Micco 2001, Hunter CJ 2004) und letztlich für einen biomechanisch voll funktionstüchtigen Gelenkknorpel.

## 7.2. Chondrozytäre Veränderungen in Kulturmodellen

Auf zellulärer Ebene treten bei in Trägermaterialien eingebetteten Chondrozyten hinsichtlich der Wahrung des chondroiden Habitus, der erhaltenen Vitalität der Zellen und auch der homogenen Zellverteilung innerhalb des Materials immer noch Probleme auf.

Für die Besiedlung von Trägermaterialien mit Chondrozyten wurden vielfältige Verfahren entwickelt. So ist es möglich, die Zellen in die Materialien zu inkorporieren, indem Zellen und Trägermaterial in einer Zellkultur gemeinsam in Suspension gebracht werden. Danach können die Zellen durch das Absetzen im Material anwachsen. So ist es beispielsweise in Kollagenmembranen oder Vliesen niemals möglich eine homogene Zellverteilung zu erzielen (Gaissmaier C 2003). Eine weitere Variante ist, die Zellen in Lösungen einzubringen und anschließend zu gelieren. Nach diesem Verfahren kann eine homogene Verteilung der Chondrozyten in Kollagengelen oder Alginatbeads erzielt werden (Gründer T 2004).



Auf Grund ihrer mangelhaften Stabilität oder ihrer Toxizität kommen diese Materialien jedoch nicht als Trägermaterialien in vivo in Betracht (Gaissmaier C 2003, Frenkel SR 2004).

Im Falle des Spongostans® wurden die Zellen durch ein kontinuierliches Mischen des Materials mit der Zellsuspension in das Trägermaterial eingebracht. Dadurch wurde eine homogene Verteilung der Zellen gewährleistet. Die homogene Zellverteilung blieb auch während der gesamten Kultivationszeit erhalten. Auch nach drei Wochen in der Zellkultur war es weder an der Oberfläche noch am Boden des Implantats zu Clusterbildungen gekommen.

Die Darstellung der Zellverteilung erfolgte mit Hilfe der DAPI-Färbung. DAPI ist ein Farbstoff, der die Zellmembranen lebender Zellen durchdringt und sich in die AT-reichen Sequenzen der DNA einlagert. In apoptotischen Zellen wird die DNA abgebaut (Stevens A 1997) und ist daher auch nicht mehr durch DAPI anfärbbar. Hierbei ist davon auszugehen, dass vorwiegend lebende Zellen angefärbt wurden.

Demgegenüber waren am Ende der dreiwöchigen Kultivationsphase in den Knorpel-Knochen-Explantaten Clusterbildungen von Chondrozyten oberhalb des subchondralen Knochens und in der Superfizialschicht des Knorpels nachweisbar. Die homogene Zellverteilung in allen Schichten, wie sich dies im frisch gewonnenen Knorpel darstellt, war aufgehoben. Bereits 1974 beschrieben Schwartz et al., dass es bei der Kultivation von Knorpelstücken zum Auswachsen von Chondrozyten aus dem Knorpel kommt (Schwartz ER 1974, Huch K 2002). Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten des Knorpels in der Zellkultur kann in der mangelhaften Versorgung mit Nährstoffen und der eingeschränkten Entsorgung von Stoffwechselmetaboliten gesehen werden. Die hierfür wesentlichen Voraussetzungen der Be- und Entlastung des Knorpels (Mollenhauer J 2003) in vitro sind in diesem Falle nicht vorhanden. Folglich findet die Proliferation der Chondrozyten insbesondere dort statt, wo diese Prozesse am besten gewährleistet sind.

Neben ihrer homogenen Zellverteilung in Trägermaterialien ist die Vitalität der Chondrozyten wesentliche Bedingung, für die erfolgreiche Durchführung eines In-vitro-Kulturmodells. Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Chondrozyten im Spongostan®-in-vitro-Modell, wurde deutlich, dass die Zellen sich in einem sehr vitalen Zustand befanden. Sie waren von einer Kollagenschicht umgeben, welche im Hinblick auf die Ergebnisse der Immunhistologie am ehesten dem Kollagen-Typ VI entsprechen dürfte. Zudem sind die zu beobachtenden aktiven Stofftransportprozesse und die reichlich

im Zytoplasma vorliegenden Matrixvesikel Ausdruck für den aktiven Struktur- und Stoffwechsel der Chondrozyten im Spongostan. Hieraus wird deutlich: Den Zellen wird im Spongostan®-in-vitro-Modell eine ausreichende Adhärenz gewährleistet. Zudem kann durch die strukturelle Beschaffenheit des Spongostans® und durch die Anordnung des Modells eine optimale Ernährung der Chondrozyten gesichert werden. Die Adhärenz und Gewährleistung einer optimalen Versorgung der Chondrozyten sind eine wesentliche Voraussetzung für Untersuchungen eines Trägermaterials in-vitro und dessen erfolgreichen Einsatz in der Knorpelzelltransplantation (Nehrer S 1997, Brittberg M 2001, Lu 2001, Woodfield TB 2002).

Veränderungen des Umgebungsmilieus führen in Kultursystemen zum Verlust von vitalen Chondrozyten sowie zum Verlust des chondroiden Habitus. Außerdem geht das typische chondroide Proteinexpressionsprofil verloren. Der Verlust von Zell-Zell-Kontakten oder auch Kontakten der Zellen mit ihrer EZM, wie dies bei der Isolation von Chondrozyten und dem anschließenden Einbringen in Trägermaterialien oder auch in der Monolayerkultur auftritt, ist mit tief greifenden Veränderungen des Stoff- und Strukturstoffwechsels verbunden (Buckwalter JA 1998b). Zusätzlich sind der Sauerstoffgehalt (Murphy CL 2001), die mechanische Belastung (Buckwalter JA 1998b, Jin M 2001) und Wachstumsfaktoren (Flechtenmacher J 1996, Sittinger M 1999, Sellers RS 2000, Gründer T 2004, Zhang Z 2005) für die Morphologie der Chondrozyten und das proteinogene Expressionsprofil essentiell. Unter in-vitro-Bedingungen sind diese Umgebungsfaktoren nicht vollständig mit den in-vivo-Bedingungen vergleichbar. Die Aufrechterhaltung des chondrozytären Phänotyps ist daher unter in-vitro-Bedingungen problematisch.

In den Knorpel-Knochen-Explantaten konnte keine Veränderung bezüglich der Morphologie der Chondrozyten festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu dedifferenzierten sich die Chondrozyten in der Monolayerkultur fibroblastär. Nur in den Regionen, wo es zur Bildung von Clustern gekommen war, konnte die typische Morphologie nahezu erhalten bleiben. Dies ist mit den in der Literatur bereits seit langem bekannten Ergebnissen deckungsgleich (Benya PD 1982). Umso wichtiger war daher der histologische Nachweis, dass die im Spongostan eingebetteten Chondrozyten, ihre chondroide Morphologie während der Kultivationsphase aufrechterhalten konnten. Die chondroide Morphologie ist für die erfolgreiche Transplantation von großer Bedeutung (Glowacki J 1983). Untersuchungen ergaben, dass sich einmal dedifferenzierte Chondrozyten nicht wieder vollständig redifferenzieren können (Dell'Accio F 2001, Darling EM 2005). Zudem konnte gezeigt

werden, dass auch die typisch räumliche Ausrichtung der Chondrozyten im neu gebildeten Knorpel eng mit der chondrozytären Morphologie verbunden ist (Bonaventure J 1994, Gugala Z 2000). Die korrekte Ausrichtung der Chondrozyten im Knorpeldefekt ist wiederum notwendig, um einen biomechanisch voll funktionstüchtigen Gelenkknorpel zu rekonstruieren.

Chondrozyten, die eher ihre typische chondroide Morphologie aufrechterhalten können, sind allerdings bezüglich ihrer Proliferationstätigkeit weit weniger aktiv (Grande DA 1999, Lee DA 2003, Gründer T 2004). Da es für den suffizienten Aufbau eines Neoknorpels aber aus den oben genannten Gründen unerlässlich ist, dass die Chondrozyten ihre typische Struktur beibehalten, muss dieser scheinbare Nachteil in Kauf genommen werden.

Auf mRNA-Ebene gilt das Verhältnis von Kollagen-Typ I/II oder dessen Kehrwert als ein anerkannter Parameter für das Dedifferenzierungsverhalten von Chondrozyten (Darling EM 2005).

Für frisch isolierte Chondrozyten ist es typisch, dass sie erheblich mehr Kollagen-Typ II als Kollagen-Typ-I-mRNA synthetisieren. Die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse unterscheiden sich daher nicht, von denen bereits in der Literatur bekannten (Benya PD 1982, Coutts RD 2001, Dell'Accio F 2001, Huch K 2002, Darling EM 2005). Erstaunlich ist aber, dass sich das Expressionsniveau, je nachdem, ob die Messung der mRNA aus dem frischen Knorpel direkt heraus erfolgte oder nach dem vorherigen Verdau des Knorpels vorgenommen wurde, erheblich unterschied. Im Vergleich zu diesen Ergebnissen ist festzustellen, dass sich während der Kultivation von Chondrozyten das mRNA-Expressionsniveau generell zu einer höheren Kollagen-Typ I und einem niedrigerem Kollagen-Typ-II-Expressionniveau verschiebt. Dies gilt insbesondere, wenn Chondrozyten im besten aller Kultursysteme, in situ, als Knorpel-Knochen-Explantat kultiviert werden. Diese Veränderungen in Monolayerkulturen sind schon vielfach publiziert worden (Benya PD 1982, Hunziker EB 2002, Huch K 2002, Lee DA 2003, Gründer T 2004, Marlovits S 2004, Darling EM 2005). Vergleichende PCR-Untersuchungen, bei denen das Expressionsprofil von Chondrozyten in kultivierten Knorpel-Knochen-Explantaten getestet wurde, sind noch nicht bekannt. Die in der Literatur vorliegenden Ergebnisse beziehen sich, wenn sie an Explantaten durchgeführt wurden, auf reine Knorpel-Explantate (Hascall V.C. 1983, Winter GM 1998, Stewart MC 2000, Di Micco MA 2002, Handley CJ 2002, Tognana E 2005, Zhang Z 2005). Dies ist erstaunlich, da doch gerade der subchondrale

Knochen für die biologische Integrität des hyalinen Knorpels von entscheidender Bedeutung ist. Er beeinflusst das biologische Verhalten des Knorpels wesentlich ( Rodan GA 1992, Reddi A 1998). Knorpel und Knochen sollten daher als Einheit betrachtet werden und als solche auch untersucht werden.

Da diese Veränderungen auch in den Knorpel-Knochen-Explantaten aufgetreten sind, gilt es demzufolge als fraglich, ob ein in Richtung Kollagen-Typ I verschobenes Expressionsniveau und damit ein Anstieg der Kollagen-Typ I/II-Ratio wirklich als ein hervorragender Dedifferenzierungsmarker gelten kann. Die Chondrozyten sind offensichtlich nicht dedifferenziert. Es handelt sich daher eher um einen Vorgang, den auch nicht dedifferenzierte Zellen während der Kultivation vollziehen, was die Beobachtungen aus den Knorpel-Knochen-Explantaten belegen.

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zum chondroiden Phänotyp wurde darüber hinaus der Transkriptionsfaktor SOX-9 untersucht. Bei SOX-9 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der sowohl die Re-Expression dedifferenzierter Zellen unterstützt als auch die Modulation und Produktion der EZM beeinflusst (Tew S 2003). Darüber hinaus ist SOX-9 entscheidend für die Induktion und Regulation des chondroiden Phänotyps (Kolettas E 2001, Malpeli M 2004). Die Expression des Transkriptionsfaktors SOX-9 bzw. dessen mRNA konnte sowohl auf proteinogener Ebene als auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Sowohl das Protein als auch die mRNA waren im Spongostan®-in-vitro-Modell wie bei frischem Knorpel in gleicher Intensität und Lage in Bezug auf den Zellkern darstellbar. In den Knorpel-Knochen-Explantaten war das SOX-9 als Protein genau wie im Spongostan®-in-vitro-Modell nachweisbar. Im Vergleich zum frischen Knorpel war hier aber die SOX-9-mRNA-Expression bereits deutlich reduziert. Auf proteinogener Ebene konnte SOX-9 in der Monolayerkultur nicht mehr nachgewiesen werden. Die Expression der entsprechenden mRNA war nur sehr schwach ausgeprägt.

Folglich können die Ergebnisse im Spongostan®-in-vitro-Modell bezüglich des Transkriptionsfaktors SOX-9 so interpretiert werden, dass die Chondrozyten hier ein dem nativen Knorpel vergleichbares Transkriptionsverhalten aufweisen. Dies beweist, dass die Chondrozyten über den Kultivationszeitraum hinweg ihren Phänotyp bewahren können.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Chondrozyten, induziert durch das Trägermaterial, inflammatorische Reaktionen zeigten. Hunziker (2002) berichtet in einem umfassenden Review über Knorpelreparaturprozesse von der Möglichkeit, dass kollagene Trägermaterialien Entzündungsreaktionen hervorrufen können. Dabei geht er insbesondere auch auf

Gelatineprodukte ein, die als Hämostyptikum gedacht sind. Er kommt zu dem Schluss, dass diese inflammatorische Wirkungen entfalten können, was den Einsatz in der MACT ausschließt. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass solche Reaktionen eher die Ausnahme sind. Die Untersuchungen mit der qualitativen PCR haben gezeigt: Nur in einem Versuchsansatz war Il-1 und VEGF als Marker für Entzündungsprozesse (Behrens P 2002) nachweisbar. Zudem weisen Gaissmaier et al. (2003) daraufhin, dass es sich bei diesen Prozessen überwiegend um In-vitro-Reaktionen handelt. In vivo besitze die Synovialflüssigkeit genügend Il-1 Rezeptorantagonisten und antiinflammatorische Stoffe, die eine durch Kollagenabbauprodukte induzierte Entzündungsreaktion verhindern.

### 7.3 Die Extrazelluläre Matrix – Säule der biomechanischen Funktionalität des hyalinen Knorpels

Die tragende Säule der biomechanischen Funktionalität des hyalinen Gelenkknorpels stellt die EZM dar.

Zu den Hauptkomponenten der EZM gehören Glykosaminoglykane (GAG) und Proteoglykane auf der einen Seite sowie Kollagene auf der anderen Seite (Mollenhauer J 1997). Proteoglykane und GAGs haben die Aufgabe, Druckbelastungen des Gelenks abzapuffern (Roughley PJ 1994, Mollenhauer J 1997). Der Gehalt dieser Komponenten der EZM differiert dabei in den einzelnen Knorpelzonen und trägt den unterschiedlichen Druckbelastungen in den verschiedenen Knorpelzonen Rechnung ( Mollenhauer J 1997, Darling EM 2004).

Die unterschiedlichen Kollagene bilden ein Netzwerk, das je nach Region des Knorpels eine unterschiedliche Dichte und Ausrichtung aufweist (Mollenhauer J 1997, Poole AR 2001).

Proteoglykane, GAGs und Kollagene gemeinsam schützen das Gelenk optimal. Sie gelten somit als einer der Hauptgründe der herausragenden Rolle, die der hyaline Knorpel für die Funktionalität eines Gelenks spielt. Aber nicht nur die rein mechanische Funktion macht eine intakt ausgebildete EZM für den hyalinen Knorpel unverzichtbar. Die EZM ist wesentlich an der Regulation des Stoff- und Strukturstoffwechsels der Chondrozyten beteiligt (Aigner T 2003, Gaissmaier C 2003). Zudem ist sie verantwortlich, die richtigen Molekülarten zu konzentrieren, welche die Aufrechterhaltung des chondroiden Phänotyps ermöglichen (Buckwalter JA 1998b).

So sind an ein mögliches Trägermaterial, das den vorübergehenden Ersatz der EZM während der Restitution bilden muss, höchste Ansprüche zu stellen. Untersuchungen bezüglich der Entwicklung der EZM in der Knorpelkultur sind von herausragender Bedeutung.

### 7.3.1 Glykosaminoglykane und Proteoglykane- Träger von Druckbelastungen

Aggrekan ist das wichtigste Proteoglykan des hyalinen Knorpels (Winter GM 1998, Poole AR 2001). Bei der Untersuchung der EZM während der Entwicklung von Knorpel in der Zellkultur gilt ihm daher höchste Aufmerksamkeit.

An Aggrekan werden im hyalinen Knorpel hochsulfatierte GAGs wie Dermatan-, Keratan-, und Chondrotinsulfat gebunden (Roughley PJ 1994). Bedingt durch die Tatsache, dass GAGs mit Sulfatgruppen konjugiert sind, besitzen sie eine negative Ladung. Da diese die Anlagerung von Gegenionen und Wasser bewirken, wird hierdurch der Schwellendruck des Knorpels reguliert.

Bei der ubiquitären Verteilung des Aggrekans in den Knorpel-Knochen-Explantaten war kein entscheidender Unterschied in der Immunhistologie im Vergleich zum frischen Knorpel feststellbar. Aggrekan besitzt eine lange Halbwertszeit, die auf Monate, in Fragmenten bis auf Jahre geschätzt wird (Maroudas A 1998). Daher blieben die Verteilung und der Gehalt an Aggrekan in der Explantatkultur unverändert.

Auch Hascall et al. (1983) berichten davon, dass es während der Kultivation von Knorpel-Explantaten zu keiner wesentlichen Änderung des Aggrekangehalts kommt. Im Gegensatz dazu wird dieses Matrixprotein und auch Kollagen-Typ II sowie Fibronectin weniger synthetisiert. Von der reduzierten Matrixsynthese in Explantatkulturen berichten auch Stewart et al. (2000). Bei allen diesen Arbeiten wurden ausschließlich Knorpel-Explantate kultiviert. Die Kultur als Knorpel-Knochen-Explantat unterscheidet sich folglich nicht.

Im Spongostan®-in-vitro-Modell wurde Aggrekan auf proteino gener Ebene umfangreicher und homogener dargestellt als in den Monolayerkulturen. Konnte Aggrekan in den Monolayerkulturen nachgewiesen werden, so beschränkte sich dies auf einzelne Zellcluster.

Bei den Untersuchungen auf mRNA-Ebene wurde deutlich: Jedes Kultursystem wies eine verminderte mRNA-Expression für Aggrekan im Vergleich zum unverdauten Knorpel und sehr deutlich im Vergleich zu isolierten Chondrozyten auf. Im Hinblick auf die bio-

logische Bedeutung der Proteoglykane ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich. Die Druckbelastung, die den physiologischen Stimulus für die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten darstellt (Pauwels F 1960), ist auch im Folgenden für die Aufrechterhaltung der Integrität des Knorpels unerlässlich (Buckwalter JA 1998b, Jin M 2001). Da dieser Stimulus aber in der Kultivationsphase entfällt, ist auch die Notwendigkeit, Proteoglykane zu produzieren, nicht mehr gegeben. Das reduzierte Expressionsniveau in allen Kultursystemen ist somit erklärbar (Jin M 2001).

Dass gleichwohl auf proteinogener Ebene ein Nachweis des Aggrekans in hoher Intensität gerade im Spongostan®-in-vitro-Modell gelang, kann möglicherweise mit dem Zeitpunkt der Messung des mRNA-Expressionsniveaus erklärt werden. Das mRNA-Expressionsniveau frisch isolierter Chondrozyten übersteigt das Expressionsniveau des unverdauten Knorpels deutlich. Die stoffwechselaktivierten Zellen gingen im Spongostanimplantat dann in die Zellkultur über. Nachgewiesenes Aggrekan kann daher als Produkt der frühen Kultivationsphase angesehen werden.

In der Zellkultur wird ein Großteil der produzierten GAGs in das Medium abgegeben, so dass sich ein Nachweis in unmittelbarer Umgebung der Chondrozyten als schwierig erweisen kann (Hauselmann HJ 1994, Sailor LZ 1996). Auch in Explantatkulturen kommt es zu einem Verlust an GAGs (Tyler JA 1985). Die GAGs wurden mit der Alcianblaufärbung angefärbt, welches dem Nachweis von sauren Mukosubstanzen dient (Romeis 1989, IRCS 2003).

Insoweit sind die Ergebnisse dieser Arbeit mit dem aus der Literatur bekannten Verhalten von Zellkulturen vergleichbar. Im Vergleich zu frischem Knorpel war in den Knorpel-Knochen-Explantaten eine abgeschwächte Alcianblau-Färbung sichtbar. Beeindruckend stark visualisiert wurden GAGs am Übergang zwischen Implantat und Defektrand im Spongostan®-in-vitro-Modell. Andererseits war der GAG-Nachweis im Inneren des Implantats nur teilweise oder gar nicht möglich. In den Monolayerkulturen konnten keine GAGs nachgewiesen werden.

Abschließend kann nicht bewiesen werden, ob die verminderte Darstellbarkeit der GAGs Ausdruck einer verminderten Produktion in den Zellkulturen ist oder die GAGs lediglich in das Nährmedium abgegeben wurden. Letztlich fehlte aber in allen untersuchten Kultursystemen der Stimulus, die Druckbelastung, eine adäquate GAG-Produktion zu betreiben. Dass hier eine Glykosaminoglykanproduktion in gleicher Weise vollzogen wird, wie dies

bei physiologisch belastetem Knorpel der Fall ist, kann dementsprechend auch nicht erwartet werden.

### 7.3.2 Die Kollagene – Träger von Torsions- und Scherkräften

Die Eigenschaft, Torsions- und Scherkräften zu widerstehen, verdankt der hyaline Gelenkknorpel der speziellen Anordnung seiner Kollagene (Mollenhauer J 2003). Die Restitution eines voll funktionstüchtigen kollagenen Netzwerks (Aigner T 2003) sollte demnach Hauptanliegen bei der Gelenkknorpel-Reparatur sein. In dieser Arbeit wurden die Knorpelkollagene-Typ II, VI und X untersucht. Zudem wurden mit den Kollagenen-Typ I und III zwei Kollagene untersucht, die nicht oder nur eingeschränkt von Chondrozyten in vivo synthetisiert werden (Benya PD 1982).

Mit fast 90 % Anteil am Gesamtkollagen nimmt das Kollagen-Typ II die wichtigste Stellung unter den Kollagenen des hyalinen Knorpels ein (Bruckner P 1994, Gelse K 2003, Horikawa O 2004). Eine adäquate Expression an Kollagen-Typ II ist daher eine wesentliche Voraussetzung für die Ausbildung eines funktionstüchtigen kollagenen Netzwerks und somit auch für die biomechanische Stabilität des hyalinen Knorpels.

In frischem Knorpel ist das Expressionsniveau an Kollagen-Typ II sowohl auf proteino-gener als auch auf mRNA-Ebene dementsprechend hoch (Poole CA 1997). Schon Benya et al. (1982) beschrieben jedoch, dass die Fähigkeit der Chondrozyten, Kollagen-Typ II zu produzieren, in der Monolayerkultur stark eingeschränkt wird und dies mit der zunehmenden Dedifferenzierung der Chondrozyten einhergeht. Kollagen-Typ II wird in Monolayerkulturen durch Expression von Kollagen-Typ I ersetzt (Benya PD 1982).

Hascall et al. (1983) beschrieben, dass die Fähigkeit der Chondrozyten, Kollagen-Typ II zu exprimieren, auch in reinen Knorpel-Explantat-Kulturen deutlich abnimmt. Untersuchungen, die das Expressionsverhalten auf Protein-Ebene und auf mRNA-Ebene in Knorpel-Knochen-Explantaten darstellen, werden in der Literatur nicht erwähnt.

In jedem der Kultursysteme war mit Hilfe der Immunhistologie Kollagen-Typ II nachweisbar. In Monolayerkulturen, wie auch beim Aggrekan-Nachweis, war dieser eher schwach ausgeprägt und auf die Bereiche der Kultur beschränkt, wo es zu Clusterbildungen gekommen war. Clusterbildungen sind in der Lage, den chondroiden Phänotyp und



auch das typische chondroide Expressionsprofil besser zu bewahren, als dies in reinen Monolayerkulturen der Fall ist (Schulze-Tanzil G 2002).

In den Explantatkulturen war Kollagen-Typ II ähnlich wie in frischem Knorpel verteilt und dargestellt. Dadurch konnte es ubiquitär in allen Knorpelzonen nachwiesen werden. Auch hier gilt ähnliches wie für die Aggrekanabbildung: Da die Halbwertszeit der Kollagene extrem lang ist (Huch K 2002), sind nach einer Kulturphase von drei Wochen noch keine Veränderungen zu erwarten. In den Spongostanimplantaten verteilte sich Kollagen-Typ II homogen um die Zellen herum. Die Ergebnisse aus der Immunhistologie waren mit den zu erwartenden Ergebnissen aus der Literatur in Bezug auf die Monolayerkulturen kongruent. In den Explantatkulturen ähnelte das Bild dem frischen Knorpel. Jedoch schien die Anfärbbarkeit insbesondere an der Oberfläche der Explantate stärker ausgeprägt als in den mittleren Zonen des Explantats. Erklärbar ist dieses Verhalten damit, dass Clusterbildungen an der Oberfläche ein stärkeres Expressionsverhalten aufweisen.

Auf mRNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass die Chondrozyten unter Kulturbedingungen ein, im Vergleich zum nativen Knorpel, stark absinkendes Expressionsniveau aufweisen. Dies verhält sich in den Explantatkulturen wie in den Spongostanimplantaten ähnlich stark. Sowohl Explantatkultur als auch Spongostanimplantat lagen jedoch unter dem mRNA-Expressionsniveau, welches die Zellen aus den Monolayerkulturen aufwiesen.

Die Ergebnisse aus dem Spongostan®-in-vitro-Modell belegen, dass die Chondrozyten in diesem Kultursystem reichlich Kollagen-Typ II synthetisieren, was für den Aufbau des kollagenen Netzwerks so wichtig ist. Auf mRNA-Ebene muss davon ausgegangen werden, dass die Chondrozyten in diesem Kulturmodell im Laufe der Kultivationsphase nach einer zunächst deutlichen Kollagen-Typ-II-Synthese im Verlauf die Expression herunterregulieren. Dieses Kultursystem befähigt aber die Chondrozyten besser zur Synthese von Kollagen-Typ II, als dies in der Monolayerkultur möglich ist. Das wird aus den Ergebnissen der Monolayerkultur deutlich. Tendenziell ähnelt das Syntheseverhalten des Kollagens-Typ II im Spongostan®-in-vitro-Modell dem der Chondrozyten in den Knorpel-Knochen-Explantaten.

Kollagen-Typ VI ist um die Chondrone des hyalinen Knorpels lokalisiert.

Das Chondron als anatomische Mikroeinheit der Chondrozyten wurde erstmals 1925 von Benninghof beschrieben (Benninghof A 1925). Die Ergebnisse aus der Immunhistologie waren mit den zu erwartenden Ergebnissen aus der Literatur in Bezug auf die Monolayerkulturen kongruent. In den Explantatkulturen ähnelte das Bild dem frischen Knorpel. Je-

doch schien die Anfärbbarkeit insbesondere an der Oberfläche der Explantate stärker ausgeprägt als in den mittleren Zonen des Explantats. Erklärbar ist dieses Verhalten damit, dass Clusterbildungen an der Oberfläche ein stärkeres Expressionsverhalten aufweisen.

Kollagen-Typ VI nimmt den Platz eines exklusiven Markers dieses Mikromilieus ein (Winter GM 1998). Aus diesem Grund kommt ihm eine wesentliche Bedeutung bei der Organisation dieser Einheit zu. Funktionalität und Integrität des Chondrons sind mit dem Vorhandensein von Kollagen-Typ VI eng verbunden (Poole CA 1992). Neben mechanischen Funktionen wie der Verankerung von Chondrozyten in ihrer perizellulären Umgebung, der Stabilisierung des radiären kollagenen Netzwerks sowie der Proteoglykane und Glykosaminoglykane, übernimmt es auch funktionelle Aufgaben. Dazu gehört die Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen, die über spezielle Rezeptoren der chondrozytären Membran vermittelt werden (Poole CA 1992, Sherwin AF 1999, Horikawa O 2004, Fraser SA 2006).

Vielfach wurde die Bedeutung beschrieben, die das Kollagen-Typ VI während Remodelingprozessen und der Entwicklung des hyalinen Knorpels hat (Kielty CM 1992, Morrison EH 1997, Handley CJ 2002, Haddo O 2004). Wie dies auch aus anderen Geweben bekannt ist, nimmt Kollagen-Typ VI die Rolle eines Remodelingkollagens ein. Mylona et al. (1995) berichten beispielsweise von solchen Prozessen im Endometrium. Das mag auch die Ursache dafür sein, dass es im Rahmen der Osteoarthritisentwicklung zu einem vermehrten Nachweis von Kollagen-Typ VI kommt (Pullig O 1999). Durch degenerativen Verlust an EZM im Rahmen des osteoarthritischen Prozesses kann dies als ein Gegenregulationsprozess der Chondrozyten gewertet werden. Sie versuchen dadurch ihre Lage zu stabilisieren und die Integrität des Knorpels zu wahren.

Sherwin et al. (1999) berichten in ihrer Arbeit davon, dass sich Kollagen-Typ-VI-mRNA in voll ausgereiftem Knorpel nur noch auf einem sehr geringen Niveau nachweisen lässt. Ähnliches berichten Quarto et al. (1993), die beschreiben, dass Kollagen-Typ VI speziell in den frühen Entwicklungsphasen verstärkt synthetisiert wird. Nach einem anfänglichen Peak ist ein Rückgang in der Syntheseleistung des sich entwickelnden Knorpels zu verzeichnen.

Welch elementare Bedeutung dieses Kollagen auch im Rahmen der Verfahrenstechnik zur Reparatur des hyalinen Knorpels zukommt, stellten Fraser et al. (2006) in einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung zur Lokalisation von Kollagen-Typ VI in Konstrukten, die durch Tissue Engineering hergestellt wurden, fest.

Laut Graff et al. (2003) ist dieses Kollagen als obligater Bestandteil einer sich entwickelnden EZM zu bewerten.

In den Knorpel-Knochen-Explantaten konnte an der Oberfläche und über dem subchondralen Knochen eine massive Ablagerung von Kollagen-Typ VI beobachtet werden, was wiederum den Bereichen entspricht, an denen auch Zellcluster nachweisbar waren. Eine ähnlich starke Expression von Kollagen-Typ VI wurde in den Spongostanimplantaten nachgewiesen. In diesen beiden Kultursystemen war einzig der Nachweis von Kollagen-Typ-VI-mRNA möglich. Diese Ergebnisse zeugen davon, dass Knorpel unter Kulturbedingungen tief greifenden Remodelingprozessen unterworfen ist.

Die Chondrozyten zeigen Ähnlichkeiten hinsichtlich des Remodeling und der Entwicklung der EZM unter Kulturbedingungen im Vergleich zu den Knorpel-Knochen-Explantaten. Dieses Ergebnis zeigt: Das Spongostan®-in-vitro-Modell eignet sich für Untersuchungen an Chondrozyten.

Kollagen-Typ VI gilt als spezielles Kollagen eines sich entwickelnden Knorpels. Sein Expressionsprozess im ausgereiften Knorpel ist eher sistierend. Das erklärt, warum ein mRNA-Nachweis in dem frischen unverdauten Knorpel nicht möglich war. Dies verdeutlicht, dass die Expression von Kollagen-Typ VI gerade nicht an das Vorhandensein von der für die Expression des ausgereiften Knorpels wichtigen Stimuli und Wachstumsfaktoren gebunden ist. Es muss im Gegenteil davon ausgegangen werden, dass gerade das Fehlen dieser physiologischen Gegebenheiten Chondrozyten dazu veranlasst, dieses Kollagen zu exprimieren.

Die Ergebnisse aus den Monolayerkulturen, in denen ein geringer Nachweis von Kollagen-Typ VI auf proteinogener Ebene gelang, nicht jedoch der Nachweis der entsprechenden mRNA, sind mit dem voranschreitenden Dedifferenzierungsprozess in der Monolayerkultur erklärbar. Da bei den frisch isolierten Zellen keine entsprechende mRNA nachgewiesen werden konnte, muss die Expression im Laufe der Kultivation stattgefunden haben. Auf Grund der Bedingungen in der Monolayerkultur, die dem typischen chondroiden Expressionsprofil nicht dienlich sind, ist darin weniger synthetisiertes Kollagen-Typ VI vorhanden als in der Spongostan®- oder Explantatkultur. Chondrozyten versuchen in der Monolayerkultur demnach nicht, Remodelingprozesse zu betreiben, wodurch die cartilaginäre Struktur gewahrt bliebe. Es kommt zu einem fortschreitenden Dedifferenzierungsprozess.

Noch nicht abschließend geklärt werden konnte, welche Funktion das Kollagen-Typ X innerhalb des hyalinen Knorpels besitzt (Gelse K 2003) .

Als gesichert gilt, dass Kollagen-Typ X von hypertrophierten Chondrozyten synthetisiert wird (Bruckner P 1994). In dieser Funktion beeinflusst es die enchondrale Ossifikation stark (Binette F 1998).

Es konnte nachgewiesen werden, dass Kollagen-Typ X auch von adulten Chondrozyten synthetisiert werden kann (IRCS 2003). Daher muss die Hypothese, dass Kollagen-Typ X als ein alleiniger Hypertrophiemarker dienen kann, als offen betrachtet werden. Zurückhaltend äußert sich auch das Committee of International Cartilage Repair Society (ICRS) (IRCS 2003) hinsichtlich der Beurteilung des histologischen Nachweises von Kollagen-Typ X im ACT-Neoknorpel. Das ICRS beschreibt, dass Kollagen-Typ X als ein Hypertrophiemarker betrachtet werden kann. Dies wird auch, von Robertson et al. (2001) dargestellt. Andererseits handelt es sich nach Aussagen des ICRS aber um ein Kollagen, was auch zur Ausbildung einer stabilen Verbindung zwischen Implantat und subchondralem Knochen notwendig ist.

In einigen Arbeiten wurde berichtet, dass dem Kollagen-Typ X in der Embryogenese des hyalinen Knorpels eine Funktion zukommt. So berichten Morrison et al. (1997) von der vorübergehenden Expression des Kollagens-Typ X bei Chondrozyten, die sich in der Entwicklung befinden. Schmid et al. (1990) belegen eine Vergesellschaftung des Kollagens-Typ X mit Kollagen-Typ II im embryonalem Knorpel. Zudem wurde die These aufgestellt, dass es sich bei Kollagen-Typ X um ein Kollagen handelt, das bei Remodellingprozessen ( Richardson JB 1999, Roberts S 2001) synthetisiert wird.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte Kollagen-Typ X im frischen Knorpel in der Zone des hypertrophierten Knorpels nachgewiesen werden. Das gleiche wurde auch bei den Knorpel-Knochen-Explantaten gezeigt. Insofern ergaben sich hier keine von der Literatur abweichenden Ergebnisse. Kollagen-Typ X ist ein Kollagen, das unstreitig in der Zone der hypertrophierten Chondrozyten synthetisiert und in dieser Funktion an der Verbindung des Knorpels mit dem subchondralem Knochen beteiligt ist.

In den Monolayerkulturen wie auch im Spongostan®-in-vitro-Modell konnte in der Immunhistologie die Expression von Kollagen-Typ X nachgewiesen werden. Da Kollagen-Typ X wahrscheinlich von Chondrozyten exprimiert wird, die sich im Umbau befinden, ist die Expression auch hiermit erklärbar.

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression fiel das erhöhte Expressionsniveau der Chondrozyten aus dem unverdauten Knorpel und aus Knorpel-Knochen-Explantaten auf. Das sehr viel höhere Expressionsniveau erklärt sich damit, dass bei der Präparation auf alle Knorpelschichten zurückgegriffen wurde. Letztlich waren so auch Chondrozyten aus der kalzifizierten Zone enthalten.

Auch der Nachweis bei den Knorpel-Knochen-Explantaten ist mit dem Nachweis in den frischen unverdauten Präparaten vergleichbar. Die Zellen sind hier möglicherweise bestrebt die Verbindung zwischen Knorpel und subchondralem Knochen aufrecht zu erhalten. Zudem wurden auch hier Zellen aus allen Knorpelzonen in die Auswertung mit einbezogen.

Im Vergleich zu den Proben aus dem frischen Knorpel fiel das Expressionsniveau schon beim Verdau der Zellen ab. Seine niedrigsten Werte erreichte es in den Kulturen der Monolayerzellen und in den Zellen des Spongostan®-in-vitro-Modells. Der nachgewiesene hohe Proteinwert in der Immunhistologie resultiert daher aus der frühen Kultivationsphase. Das Expressionsniveau ist zum Zeitpunkt der Messung nach drei Wochen sehr niedrig. Die Synthese von Kollagen-Typ X in dem Spongostan®-in-vitro-Modell ausschließlich als ein negatives Signal zu werten, ist sicher nicht richtig. Immerhin gilt Kollagen-Typ X als ein Remodelingkollagen. Zudem konnte die Synthese dieses Kollagens in der Embryogenese nachgewiesen werden. Die Synthese gilt als essentielle Voraussetzung einer Verbindung des Implantats mit dem subchondralen Knochen und zeugt von Entwicklungsprozessen des hyalinen Knorpels.

Wie auch bei Kollagen-Typ VI beschrieben, findet während der Kultivation von Chondrozyten innerhalb des Spongostan®-in-vitro-Modells ein massives Remodeling statt. Die Chondrozyten beginnen sich zu organisieren, so dass letztlich Kollagene synthetisiert werden, die für deren Neuorganisation vorteilhaft sind.

Kollagen-Typ I und Kollagen-Typ II unterscheiden sich in der chemischen Struktur nur hinsichtlich einer Kette. Kollagen-Typ I hat neben den aus dem Kollagen-Typ II identischen  $\alpha_1$ -Ketten zusätzlich eine  $\alpha_2$ -Kette (Gelse K 2003). Trotzdem unterscheiden sich ihre Syntheseorte und ihre biomechanischen Eigenschaften grundsätzlich. Während das Kollagen-Typ I v.a. dazu dient, Zugkräften zu widerstehen, besteht die Hauptaufgabe des Kollagens Typ II in der Verteilung von Scher- und Torsionskräfte (Aigner T 2003). Hieraus folgt auch die unterschiedliche Verteilung dieser Kollagene auf die verschiedenen Gewebe. Kollagen-Typ I stellt bspw. ca. 90 % der organischen Masse des Knochens. Es

ist der Hauptbestandteil des kollagenen Grundgerüsts von Sehnen und Bändern ( Bruckner P 1994, Gelse K 2003). Im reifen hyalinen Knorpel kommt es für gewöhnlich nicht vor. Eine Teilkomponente bildet es im Faserknorpel und ist ungefähr mit einem gleich starken Anteil wie das Kollagen-Typ II vertreten (Aigner T 2003).

Auch Kollagen-Typ III kommt nicht im ausgereiften Knorpel vor (Gelse K 2003). Es ist häufig mit Kollagen-Typ I vergesellschaftet und bildet mit diesem gemeinsam Mixfibrillen.

Schon seit langem ist bekannt, dass Chondrozyten, wie oben bereits beschrieben wurde, unter Zellkulturbedingungen ihren Phänotyp modifizieren. Zudem ändern sie ihr kollagenes Expressionsprofil (Benya PD 1982). Dabei wird beobachtet, dass die Chondrozyten die Synthese des Kollagens Typ II zugunsten von knorpelunspezifischen Kollagenen und hierbei insbesondere zugunsten des Kollagens-Typ I herunterregulieren (Benya PD 1982, Darling EM 2005).

Somit erklären sich auch die in dieser Arbeit ermittelten Untersuchungsergebnisse hinsichtlich des Expressionsverhaltens der knorpeluntypischen Kollagene-Typ I und Typ III. Gleiches gilt für den Vergleich des Expressionsniveaus im unverdauten Knorpel mit dem in frisch isolierten Chondrozyten.

Beim Kollagen-Typ I ließ sich in frischem unverdaulichem Knorpel an dessen Oberfläche ein zarter Saum nachweisen. Die mittleren und tiefen Zonen waren mit Ausnahme des direkten Übergangs zum subchondralen Knochen Kollagen-Typ I negativ.

Während der Kultur der Knorpel-Knochen-Explantate konnte beobachtet werden, dass es insbesondere an der Oberfläche zu einer deutlichen Verbreitung des Kollagen-Typ I positiven Saums gekommen war. Folglich nahm während der Kultivation an der Oberfläche im Bereich der Zellcluster die Kollagen-Typ-I-Synthese deutlich zu.

Die Schlussfolgerung, dass nicht nur phänotypisch dedifferenzierte Chondrozyten mit der Kollagen-Typ-I-Synthese unter Zellkulturbedingungen beginnen, sondern auch Chondrozyten, die sich noch im Knorpel befinden und phänotypisch nicht dedifferenziert sind, liegt also nahe. Ähnliche Beobachtungen sind auch schon von Zheng et al. (2004) berichtet worden. Dies gilt nicht zuletzt auch für die Chondrozyten im Spongostan®-in-vitro-Modell. Bei ihnen konnte eindeutig gezeigt werden, dass sie ihrem Phänotyp nach zu urteilen, auch nach drei Wochen Kultivation weiterhin als Chondrozyten zu erkennen waren. Fibroblastär dedifferenzierte Chondrozyten waren nicht vorzufinden. Ein typischer, speziell den Chondrozyten eigener Transkriptionsfaktor, SOX-9, konnte sowohl auf pro-

teinogener Ebene als auch auf Ebene der mRNA nachgewiesen werden. Trotzdem konnte auch hier die Synthese des knorpelunspezifischen Kollagens Typ I mit Hilfe der Immunhistologie belegt werden.

Die immunhistologischen Ergebnisse der Monolayerkultur bestätigten die Resultate, welche vielen Autoren bereits für die Kultur von Chondrozyten im Monolayer beschrieben haben. Der Nachweis von Kollagen-Typ I war ubiquitär möglich.

Auf mRNA-Ebene war zu beobachten, dass sich das mRNA-Expressionsniveau der Knorpel-Knochen-Explantate nur wenig von dem des unverdauten Knorpels und den Monolayerkulturen unterschied. Andererseits hatten die frisch isolierten Chondrozyten und die Chondrozyten des Spongostan®-in-vitro-Modells zu der vorgenannten Gruppe ein vergleichsweise niedrigeres mRNA-Expressionsniveau für Kollagen-Typ I.

Die Ergebnisse aus der Immunhistologie und aus den molekularbiologischen Untersuchungen unterscheiden sich auch hier deutlich. Erwartungsgemäß sollte im unverdauten Knorpel das niedrigste Expressionsniveau vorliegen. Schließlich beschränkte sich hier der Nachweis des Kollagens-Typ I auf einen zarten Saum an der Oberfläche. Die große Masse des Knorpels war komplett für den Kollagen-Typ I Nachweis negativ. Es wurde auch in der Literatur beschrieben, dass Kollagen-Typ-I-mRNA in Chondrozyten nur auf einem sehr niedrigen Niveau nachgewiesen wird (Marlovits S 2004, Darling EM 2005). Jedoch werden diese Daten zumeist aus isolierten Chondrozyten gewonnen. Der Nachweis erfolgt fast nie direkt aus dem unverdauten Knorpel (Marlovits S 2004, Darling EM 2005). Wie schon oben bei den Untersuchungen zu Kollagen I/II-Ratio beschrieben wurde, unterscheidet sich die Höhe der einzelnen Expressionsausprägungen jedoch deutlich, je nachdem, ob die RNA-Extraktion aus dem unverdauten Knorpel oder aus dem verdauten Knorpel erfolgt. Dies sollte beachtet werden, wenn das mRNA-Expressionsniveau von Chondrozyten untersucht wird. Demzufolge kam es durch die Isolation der Chondrozyten zu einem Absinken des Expressionsniveaus.

Gelten die isolierten Chondrozyten als Ausgangspunkt der Kultur, so kommt es im Verlauf der Monolayerkultur zu einem Anstieg der Kollagen-Typ-I-mRNA-Expression. Dieses Ergebnis war eine Bestätigung der aus der Literatur bekannten Daten. Für das Spongostan®-in-vitro-Modell gilt dies aber nicht. Das Expressionsniveau der Chondrozyten blieb, wie das der isolierten Chondrozyten, in nahezu gleicher Höhe erhalten. In den Explantatkulturen liegt ein ähnliches Expressionsniveau wie beim unverdauten Knorpel vor.

Kollagen-Typ III konnte in der Immunhistologie nur in der Monolayerkultur und im Spongostan®-in-vitro-Modell nachgewiesen werden.

Auf mRNA-Ebene war zu beobachten, dass im unverdauten frischen Knorpel, mRNA nachweisbar war, obwohl Kollagen-Typ III als ein für den Knorpel untypisches Kollagen gilt. Im Verlauf der Kultivation der Knorpel-Knochen-Explantate kommt es schließlich zu einem Anstieg der mRNA-Expression. Das Protein konnte aber auch hier nicht nachgewiesen werden.

Beim Verdau von Knorpel ist ein sprunghafter Anstieg der mRNA-Expression bezüglich Kollagen-Typ III zu beobachten. Dieses hohe Expressionsniveau wird von den isolierten Chondrozyten nach dem Überführen in die Kulturmodelle nicht gehalten. Dabei ist der Expressionsabfall im Spongostan®-in-vitro-Modell noch deutlicher als in der Monolayerkultur. Außerdem erfolgt in diesen beiden Kulturmodellen anschließend die Translation der RNA. Somit fällt der Nachweis in der Immunhistologie positiv aus.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es durch das Herauslösen der Chondrozyten aus dem Zellverband und insbesondere aus der EZM zu einem veränderten Translationsverhalten kommt. Offensichtlich übt die EZM eine Funktion aus, die die Translation der Kollagen-Typ-III-mRNA unterdrückt. Schließlich konnte Kollagen-Typ III weder im frischen unverdauten Knorpel als auch in den Knorpel-Knochen-Explantaten nachgewiesen werden. Entfällt der Einfluss der EZM, steigt die Kollagen-Typ-III-mRNA-Expression deutlich an. Auch in der jüngeren Literatur wird die Rolle des Kollagen-Typ III als ein Remodelingprotein des hyalinen Knorpels diskutiert (Eyre DR 2006). Dies wäre wie beim Kollagen-Typ VI ein weiteres wichtiges Indiz für die umfangreichen Neustrukturierungsprozesse der Chondrozyten im Spongostan®.

Es gilt für die Kollagene, die einen Hauptbestandteil der EZM bilden, zusammenfassend das Gleiche wie für die Proteoglykane und GAGs: Ihr Syntheseverhalten wird wesentlich von äußeren Stimuli mitbestimmt. Hierbei spielen Wachstumsfaktoren (Flechtenmacher J 1996, Sittinger M 1999, Sellers RS 2000, Gründer T 2004, Zhang Z 2005), Sauerstoffgehalt (Murphy CL 2001) und nicht zuletzt mechanische Einflussgrößen (Buckwalter JA 1998b, Jin M 2001) eine herausragende Rolle. Der Einfluss mechanischer Faktoren legt schon in der Entwicklungsphase fest, ob aus einer mesenchymalen Stammzelle, deren Abkömmlinge Chondrozyten und Fibroblasten sind, unter Zugbelastung ein Fibroblast bzw. Tendozyt wird oder sich unter Druckbelastung ein Chondrozyt herausbildet



(Pauwels F 1960). Nicht verwunderlich ist daher, dass sich bei Wegfall mechanischen Stimuli ein Mix knorpeltypischer als auch knorpeluntypischer Kollagene herausbildet.

## 8. Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen: Das Hämostyptikum Spongostan® hat das Potenzial, als Trägermaterial in der Autologe Chondrozytentransplantation eingesetzt zu werden. Das Material wurde erstmals von Goodstone et al. (2002) unter der Fragestellung untersucht, welchen Effekt Hyaluronsäure auf die Kulturbedingungen von Chondrozyten in Spongostan® hat. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass es sich bei Spongostan® um ein mögliches Trägermaterial handelt. Wesentliche Daten hinsichtlich des Expressionsverhaltens der Kollagene wurden nicht dargestellt. Zudem wurden ausschließlich Chondrozyten in Spongostan® kultiviert. Der Einfluss des Umgebungsknorpels und des subchondralen Knochens blieben unberücksichtigt.

Erstmals wird in dieser Arbeit die Konstruktion eines Hybridkultursystems bestehend aus Knorpel-Knochen-Explantaten, in denen sich in Spongostan® eingebettete Chondrozyten befinden, beschrieben.

Dabei konnte die Formstabilität des Trägermaterials in der Zellkultur belegt werden. Es handelt sich dabei um eine wesentliche Voraussetzung, damit das Implantat in den Knorpeldefekt erfolgreich einwachsen kann und somit als Trägermaterial Verwendung in der Transplantationschirurgie finden kann. Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse weisen darauf hin, dass es zu einer aktiven Interaktion zwischen Implantat und den Defekträndern gekommen war. Somit ist die Hoffnung berechtigt, dass ein Einwachsen von Chondrozytenimplantaten mit Spongostan® als Trägermaterial in Knorpeldefekte sufficient gelingen kann.

Innerhalb des Trägermaterials verteilten sich die Zellen homogen. Erhalten blieb dieser Zustand auf Grund der Struktur des Spongostans®, die über den gesamten Kultivationszeitraum hinweg eine umfassende Versorgung der Chondrozyten gewährleistet. Dem stehen die Ergebnisse aus der Explantatkultur gegenüber. Insbesondere an der Oberfläche des Knorpels kam es zu Clusterbildungen, in den mittleren Zellschichten konnte eine relative Zellverarmung beobachtet werden. Dies liegt darin begründet, dass die Be- und Entlastung in der Zellkultur ausblieb, was auch die Versorgung des Knorpels mit Nährstoffen und seine Entsorgung von Stoffwechselmetaboliten verhinderte.

Es konnte gezeigt werden, dass die Chondrozyten im Spongostan®-in-vitro-Modell vital bleiben und ihren chondroiden Phänotyp wahren. Gegensätzlich dazu verhalten sich

Chondrozyten in der Monolayerkultur. Nach drei Wochen Kultivation war es zu einer überwiegenden morphologischen Dedifferenzierung gekommen. Darling et al. (2005) und auch Dell'Accio et al. (2001) konnten in ihren Arbeiten belegen, dass einmal dedifferenzierte Chondrozyten nur schwer redifferenzierbar sind. Der erfolgreiche Einsatz von dedifferenzierten Chondrozyten ist in der ACT deshalb nicht möglich.

Demzufolge ist die Erkenntnis, dass die Morphologie der Chondrozyten im Spongostan®-in-vitro-Modell erhalten bleibt, wichtig. Daher ist unter In-vivo-Bedingungen davon auszugehen, dass die Chondrozyten zu einem typisch chondroidem Expressionsprofil schneller zurückkehren, als dies in der Monolayerkultur dedifferenzierte Chondrozyten können.

In der Literatur beschriebene inflammatorische Wirkungen kollagener Trägermaterialien (Hunziker EB 2002, Gaissmaier C 2003) bestätigten sich nicht. Spongostan® gehört daher nicht zu den Trägermaterialien, die Entzündungsprozesse bei Chondrozyten in-vitro auslösen.

Komponenten der Extrazellulären Matrix, die für den Neuaufbau von Knorpel bedeutsam sind, konnten im Spongostan®-in-vitro-Modell nachgewiesen werden. Außer dem Proteoglykan Aggrecan waren die für den Knorpel wichtigen Kollagen-Typen II und VI nachweisbar. Welche Bedeutung letztlich das nachweisbare Kollagen-Typ X hat muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Dessen Funktion in der Entwicklung des hyalinen Knorpels konnte wissenschaftlich noch nicht abschließend geklärt werden. Zusätzlich dazu wurden auch die Kollagen-Typen I und III nachgewiesen, die als nicht knorpelspezifische Kollagene gelten. Auch in der Explantatkultur war mit dem Kollagen-Typ I ein nicht knorpelspezifisches Kollagen nachweisbar. Folglich wird auch von Knorpel im nativen Zustand in-vitro Kollagen-Typ I gebildet.

Physiologisch vorhandene Stimuli, die durch die mechanische Beanspruchung oder auch durch Wachstumsfaktoren vermittelt werden, fehlten in der Zellkultur. Das Fehlen dieser Faktoren führt letztlich zu einem veränderten Expressionsverhalten hinsichtlich der typischen Komponenten der EZM des hyalinen Knorpels. Diese Veränderungen treten in allen Kultursystemen auf. Angefangen von der Chondrozytenisolation bis zur abschließenden Kultivation wurden deutliche Unterschiede hinsichtlich des mRNA-Expressionsverhaltens festgestellt. Auch Chondrozyten in den Knorpel-Knochen-Explantaten veränderten ihr Transkriptions- und Translationsverhalten. Die Sensibilität des hyalinen Knorpels und der Chondrozyten wird hieraus deutlich. Hiermit konnte ge-

zeigt werden, mit welchen Schwierigkeiten In-vitro-Untersuchungen an hyalinem Knorpel und Chondrozyten verbunden sind.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Parameter, Morphologie und Vitalität der Chondrozyten einerseits sowie knorpeltypische Kollagene und Glykosaminoglykane als Ausdruck einer gelungenen EZM-Synthese andererseits, dienen nach dem derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand dazu, um die Güte eines neu gebildeten Knorpels zu belegen (z.B. (IRCS 2003). Außer Acht gelassen wird dabei die Tatsache, dass es sich hierbei nur um Einzelbetrachtungen von Parametern eines sehr komplexen Systems eines Gewebes handelt.

Wesentliche Prozesse in der Physiologie und Entwicklung des hyalinen Knorpels sind bisher ungeklärt. So steht die Erforschung des Einflusses von Wachstumsfaktoren und wichtigen Signaltransduktionsprozessen, die die Integrität des hyalinen Knorpels aufrechterhalten noch am Anfang. Ebenso sind Untersuchungen in Bioreaktoren, die den Chondrozyten physiologischen mechanischen Stimuli in-vitro aussetzen immer noch eher die Ausnahme als die Regel.

Die abschließende Klärung, ob Spongostan® das Potenzial erfüllt, um als ein Trägermaterial in der MACT zu dienen, müssen daher in weitergehenden Untersuchungen geklärt werden. In-vitro sollte dabei der Einfluss von Wachstumsfaktoren und mechanischen Stimulationen berücksichtigt werden. Keine In-vitro-Untersuchung kann aber das besondere Milieu eines Gelenks suffizient nachbilden. In-vivo-Untersuchungen sind daher für eine abschließende Klärung der Frage, ob Spongostan® wirklich verwendbar ist, unverzichtbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen allerdings eindeutig: Das entwickelte Spongostan®-in-vitro-Kulturmodell war für erste Untersuchungen des In-vitro-Verhaltens von Chondrozyten im Spongostan® tauglich.

## 9. Literaturverzeichnis

- Adolphe M, Benya P. 1992. Different types of cultured chondrocytes- the in vitro approach to study of biological regulation. In: M.Aldophe, Hrsg. Biological regulation of chondrocytes. 2te Aufl. Ann Arbor Michigan: CRC Press, 105-139.
- Aigner T, Stove J. 2003. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. Adv Drug Deliv Rev, 55(12):1569-1593.
- Akeson WH, Bugbee W, Chu C, Giurea A. 2001. Differences in mesenchymal tissue repair. Clin Orthop, (Suppl 391):124-141.
- Angermann P, Riegels-Nielsen P, Pederson H. 1998. Osteochondritis dissecans of the femoral condyle treated with periosteal transplantation. Poor outcome in 14 patients followed for 6-9 years. Acta Orthop Scand, 69:595-597.
- Barbucci R, Magnani A, Rappuoli R, Lamponi S, Consumi M. 2000. Immobilisation of sulphated hyaluron for improved biocompatibility. J Inorg Biochem, 79:119-125.
- Behrens P, Bruns J, Erggelet C, Esenwein S, Gaissmaier C, Gelke C, Krackhardt T, Marlovits S, Mollenhauer J, Niethard FU, Perka C, Ruhnau K, Schneider U, Steinwachs M, Weise K. 2002. [Indications and implementation of recommendations of the working group "Tissue Regeneration and Tissue Substitutes" for autologous chondrocytes transplantation (ACT)]. Z Orthop, 140:132-137.
- Benninghof A. 1925. Form und Bau der Gelenkknorpel in Ihren Beziehungen zur Funktion. Zweiter Teil: Der Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion. Zschr Zellforsch, 2:783-862.

- Bentley G, Biant LC, Carrington RW, Akmal M, Goldberg A, Williams AM, Skinner JA, Pringle J. 2003. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee.  
J Bone Joint Surg Br, 85(2):223-230.
- Benya PD, Shaffer JD. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell, 30(1):215-224.
- Binette F, McQuaid DP, Haudenschild DR, Yaeger PC, McPherson JM, Tubo R. 1998. Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro.  
J Orthop Res, 16(2):207-216.
- Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P. 1994. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Exp Cell Res, 212(1):97-104.
- Bouwmeester PS, Kuijer R, Homminga GN, Bulstra SK, Geesink RG. 2002. A retrospective analysis of two independent prospective cartilage repair studies: autogenous perichondral grafting versus subchondral drilling 10 years follow up.  
J Orthop Res, 20:267-273.
- Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. 1996. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. Biomaterials, 17(2):137-146.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med, 331(14):889-895.
- Brittberg M, Tallheden T, Sjogren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L. 2001. Autologous Chondrocytes Used for Articular Cartilage Repair: An Update.  
Clin Orthop Relat Res, (391 Suppl):S337-348.
- Bruckner P, van der Rest M. 1994. Structure and function of cartilage collagens.

- Microsc Res Tech, 28(5):378-384.
- Buckwalter JA. 1998a. Articular cartilage: injuries and potential for healing. J Orthop Sports Phys Ther, 28(4):192-202.
- Buckwalter JA. 1999. Evaluating methods of restoring cartilaginous articular surfaces. Clin Orthop, 367:224-228.
- Buckwalter JA. 2002. Articular cartilage injuries. Clin Orthop Relat Res, (402):21-37.
- Buckwalter JA, Mankin H. 1998b. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. Instr Course Lect 1998, 47:477-486.
- Bugbee WD, Convery FR. 1999. Osteochondral allograft transplantation. Clin Sports Med, 18(1): :67-75.
- Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE. 1999a. Repair of articular cartilage defects: part II. Treatment options. Am J Orthop, 28(2):88-96.
- Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE. 1999b. Repair of articular cartilage defects: part I. Basic Science of cartilage healing. Am J Orthop, 28(1):31-33.
- Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer R. 1991. Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. J Biomech Eng, 113(2):143-151.
- Coutts RD, Healy RM, Ostrander Roger, Sah RL, Goomer R, Amiel D. 2001. Matrices for Cartilage Repair. Clin Orthop, (391)Suppl:S271-S279.
- Darling EM, Athanasiou KA. 2005. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. J Orthop Res, 23(2):425-432.
- Darling EM, Hu JC, Athanasiou KA. 2004. Zonal and topographical differences in articular cartilage gene expression. J Orthop Res, 22(6):1182-1187.

- Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP. 2001. Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum*, 44(7):1608-1619.
- Di Micco. 2001. Integrative cartilage repair: adhesive strength correlates with collagen deposition. *J Orthop Res*, 19:1105-1112.
- Di Micco MA, Waters SN, Akeson WH, Sah RL. 2002. Integrative articular cartilage repair: dependence on developmental stage and collagen metabolism. *Osteoarthritis cartilage*, 10(3):218-225.
- Diduch D, Jordan L, Mierisch C, Balian G. 2000. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy*, 16:571-577.
- Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. 2006. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur Cell Mater*, 2;12: :57-63.
- Flechtenmacher J, Huch K, Thonar EJ, Mollenhauer JA, Davies SR, Schmid TM, Puhl W, Sampath TK, Aydelotte MB, Kuettner KE. 1996. Recombinant human osteogenic protein 1 is a potent stimulator of the synthesis of cartilage proteoglycans and collagens by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 39(11):1896-1904.
- Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F. 2000. Articular cartilage repair in rabbits using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials*, 2000:795-801.
- Fraser SA, Crawford A, Frazer A, Dickinson S, Hollander AP, Brook IM, Hatton PV. 2006. Localization of Type VI Collagen in Tissue-Engineered Cartilage on Polymer Scaffolds. *Tissue Eng*, [Epub ahead of print]



- Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 1995. Tissue Engineering of Cartilage.  
In: JD B, Hrsg. Biomedical Engineering. Aufl. Hartford: CRC Press, 1788-1806.
- Frenkel SR, Di Cesare PE. 2004. Scaffolds for articular cartilage repair.  
Ann Biomed Eng, 32(1):26-34.
- Gaissmaier C, Fritz J, Benz K, Stoop R, Schewe B, Weise K. 2003. Biomaterialien für die Transplantation chondrogener Zellen zur biologischen Rekonstruktion artikulärer Knorpeldefekte. SFA Arthroskopie Aktuell, 16:4-14.
- Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. 2000. Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis.  
Ann Intern Med, 133:321-328.
- Gelse K, Pöschl E, Aigner T. 2003. Collagens-structure, function, and biosynthesis.  
Adv Drug Deliv Rev, 55:1531-1546.
- Glowacki J, Trepman E, Folkman J. 1983. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. Proc Soc Exp Biol Med, 172:93-98.
- Goa KL, Benfield P. 1994. Hyaluronic acid- a review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. Drugs, 47:536-566.
- Goodstone N, Gargiulo B, Cartwright A, Ashton B. 2002. Effects of high molecular weight hyaluron on chondrocytes cultured within spongostan, a resorbable gelatin sponge. European Cells and Materials, 4 Suppl 2:9-10.
- Graff RD, Kelley SS, Lee GM. 2003. Role of pericellular matrix in development of a mechanically functional neocartilage. Biotechnol Bioeng, 82(4):457-464.
- Grande DA. 1999. Cartilage tissue engineering: Current limitations and solutions. Clin Orthop, (367) Suppl:S176-S185.

- Grifka J, Anders S, Löhnert J, Baag R, Feldt S. 2000. Regeneration von Gelenkknorpel durch die autologe Chondrozytentransplantation. *Arthroskopie*, 13:113-122.
- Gross AE. 2002. Repair of cartilage defects in the knee. *J Knee Surg*, 15:167-169.
- Gründer T, Gaissmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J, Aicher WK. 2004. Bone morphogenic protein (BMP)-2 enhance the expression of type II collagen and aggrecan embedded in alginate beads. *Osteoarthritis cartilage*, 12 (7):559-567.
- Gugala Z, Gogolewski S. 2000. In vitro growth and activity of primary chondrocytes on a resorbable polylactide three-dimensional scaffold. *J Biomed Mater Res*, 49(2):183-191.
- Haddo O, Mahroof S, Higgs D, David L, Pringle J, Bayliss M, Cannon SR, Briggs TW. 2004. The use of chondroide membrane in autologous chondrocyte implantation. *Knee*, 11(1):51-55.
- Handley CJ WG, Ilic MZ, Ross JM, Anthony Poole C, Clem Robinson H. 2002. Distribution of newly synthesized aggrecan in explant cultures of bovine cartilage treated with retinoic acid. *Matrix Biol*, 21(7):579-592.
- Hangody L, Fules P. 2003. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am*, 85 (Suppl 2):25-32.
- Hangody L, Rathonyi GK, Duska Z, Vaserhelyi G Fules P, Modis L. 2004. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am*, 86 (Suppl 1):65-72.

- Hascall V.C., Sandy J.D., Handley C.J. 1983. The effect of serum on biosynthesis of proteoglycans by bovine articular cartilage in culture.  
Arch Biochem Biophys, 224:206-223.
- Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ. 1994. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. J Cell Sci, 107(Pt 1):17-27.
- Heinzeller T. 2001. Binde- und Stützgewebe. In: Böck P, Hrsg. Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg. Aufl 2. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 77.
- Homminga GN, Buma P, Koot HW, van der Kraan PM, van den Berg WB. 1993. Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. Acta Orthop Scand;., 64(4):441-445.
- Horikawa O, Nakajima H, Kikuchi T, Ichimura S, Yamada H, Fujikawa K, Toyama Y. 2004. Distribution of type VI collagen in chondrocyte microenvironment: study of chondrons isolated from human normal and degenerative articular cartilage and cultured chondrocytes. J Orthop Sci, 9(1):29-36.
- Huch K, Stove J, Puhl W, Gunther KP. 2002. [Review and comparison of culture-techniques for articular chondrocytes]. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 140(2):145-152.
- Hunter CJ, Levenston ME. 2004. Maturation and integration of tissue-engineered cartilages within an in vitro defect repair model. Tissue Eng, 10(5-6):736-746.
- Hunter DJ, March L, Sambrook PN. 2002. Knee osteoarthritis: the influence of environmental factors. Clin Exp Rheumatol, 20:93-100.
- Hunter W. 1743. Of the structure and disease of articulating cartilages.  
Clin Orthop Relat Res, (317):3-6.

- Hunziker EB. 2002. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress.  
A review of the current status and prospects.  
Osteoarthritis Cartilage, 10(6):432-463.
- Hunziker EB, Kapfinger E. 1998. Removal of proteoglycans from the surface of defects  
in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells.  
J Bone Joint Surg Br, 80(1):144-150.
- Hunziker EB, Quinn TM. 2003. Surgical removal of articular cartilage leads to loss of  
chondrocytes from cartilage bordering the wound edge.  
J Bone Joint Surg Am, 85-A Suppl 2:85-92.
- IRCS, Histology Endpoint Committee of The International Cartilage Repair Society. 2003.  
Histological Assessment of Cartilage Repair: A Report by the Histology Endpoint  
Committee of International Cartilage Repair Society (ICRS).  
J Bone Joint Surg Am, 85:45-57.
- Itay S, Abramovici A, Nevo Z. 1987. Use of cultured embryonal epiphyseal chondrocytes  
as grafts for defects in chick articular cartilage. Clin Orthop, 220:284-303.
- Jakob RP, Franz T, Gautier E, Mainil-Varlet P. 2002. Autologous osteochondral grafting  
in the knee: indication, results, and reflections.  
Clin Orthop Relat Res, 401:170-184.
- Jennings L, Wu L, King KB, Hammerle H, Cs-Szabo G, Mollenhauer J. 2001.  
The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of  
bovine and human chondrocytes. Connect Tissue Res, 42:71-86.
- Jensen CH, Rofail S. 1999. Knee injury and obesity in patients undergoing total knee  
replacement: a retrospective study in 115 patients. J Orthop Sci, 4:5-7.

- Jin M, Frank EH, Quinn TM, Hunziker EB, Grodzinsky AJ. 2001.  
Tissue shear deformation stimulates proteoglycan and protein biosynthesis in bovine cartilage explants. *Arch Biochem Biophys*, 395(1):41-48.
- Kielty CM, Whittaker SP, Grant ME, Shuttleworth CA. 1992.  
Type VI collagen microfibrils: evidence for a structural association with hyaluronan. *J Cell Biol*, 118(4):979-990.
- Kolettas E, Muir HI, Barrett JC, Hardingham TE. 2001. Chondrocyte phenotype and cell survival are regulated by culture conditions and by specific cytokines through the expression of Sox-9 transcription factor.  
*Rheumatology (Oxford)*, 40(10):1146-1156.
- Kuo CK LW, Mauck RL, Tuan RS. 2006. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol*, 18(1):64-73.
- Lau EC, Cooper C, Lam D, Chan VN, Tsang KK, Sham A. 2000. Factors associated with osteoarthritis of the hip and knee in Hong Kong Chinese: obesity, joint injury and occupational activities. *Am J Epidemiol*, 152:855-862.
- LeBaron RG. 2000. Ex vivo synthesis of articular cartilage. *Biomaterials*, 21:2575-2587.
- Lee DA, Reisler T, Bader DL. 2003. Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques. *Acta Orthop Scand*, 74(1):6-15.
- Lee MC. 2000. Adhesive force of chondrocytes to cartilage. Effects of chondroitinase ABC. *Clin Orthop Relat Res*, 370:286-294.
- Lu L, , Zhu,X, Valenzuela RG, Currier BL, Yaszemski MJ. 2001. Biodegradable polymer scaffolds for cartilage tissue engineering.  
*Clin Orthop Relat Res*, Suppl (391):S251-S270.

- Madsen BL, Noer HH, Carstensen JP, Normark F. 2000. Long-term results of periosteal transplantation in osteochondrosis dissecans of the knee. *Orthopedics*, 23:223-226.
- Malpeli M, Randazzo N, Cancerdda R, Dozin B. 2004. Serum-free growth medium sustains commitment of human articular chondrocyte through maintenance of Sox9 expression. *Tissue Eng*, 10(1-2):145-155.
- Marlovits S, Hombauer M, Truppe M., Vecsei V, Schlegel W. 2004. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br*, 86-B:286-295.
- Maroudas A, Bayliss MT, Uchitel-Kaushansky N, Schneiderman R, Gilav E. 1998. Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. *Arch Biochem Biophys*, 350(1):61-71.
- Martin JA, Buckwalter JA. 1996. Articular cartilage aging and degeneration. *Sports Med and Arthroscop*, 4:263-275.
- Martin JA BJ. 2001. Roles of articular cartilage aging and chondrocytes senescence in the pathogenesis of osteoarthritis lowa. *Orthop J*, 21:1-7.
- Martinek V, Fu FH, Lee CW, Huard J. 2001. Treatment of osteochondral injuries. Genetic engineering. *Clin Sports Med*, 20:403-416.
- Messner K, Maletius W. 1996. The long-term prognosis of severge damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop Scand*, 67:165-168.
- Meyers MH, Akeson W, Convery FR. 1989. Resurfacing of the knee with fresh osteochondral allograft. *J Bone Joint Surg Am*, 71(5):704-713.
- Minas T. 1998. Chondrocyte implantation in the repair of chondral lesions of the knee: economics and quality of life. *Am J Orthop*, 27(11):739-744.

- Minas T, Nehrer S. 1997. Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics*, 20(6):525-538.
- Mitchel N, Shepard N. 1987. Effect of patellar shaving in the rabbit. *J Orthop Res*, 5:388-392.
- Mollenhauer J, Aurich M. 2003. Grundlegendes zum Gelenkknorpel. In: Fritz J, Aicher WK, Eichhorn HJ, Hrsg. *Praxisleitfaden der Knorpelreparatur*. 1te Aufl. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 3-10.
- Mollenhauer J, Kuettner KE. 1997. Articular Cartilage. In: Dee R. HL, Grubner M., Kottmeier S., Hrsg. *Principles of Orthopaedic Practice*. 2te Aufl. McGraw-Hill:
- Moretti M, Wendt D, Schaefer D, Jakob M, Hunziker EB, Heberer M, Martin I. 2005. Structural characterization and reliable biomechanical assessment of integrative cartilage repair. *J Biomech*, 38(9):1846-1854.
- Morrison EH, Ferguson MW, Bayliss MT, Archer CW. 1997. The development of articular cartilage: I. The spatial and temporal patterns of collagen types. *J Anat*, 190 ( Pt 4):623-627.
- Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ. 2002. A controlled trial of arthroscopic surgery for a osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*, 347:81-88.
- Muir H. 1995. The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. *Bioessays*, 17(12):1039-1048.
- Müller W, Kohn D. 1999. Indikation und Durchführung der Knorpel- Knochen-Anbohrung nach Pridie. *Der Orthopäde*, 28:4-10.

- Murphy CL SA. 2001. Effect of oxygen tension and alginate encapsulation on restoration of the differentiated phenotype of passaged chondrocytes. *Tissue Eng*, 7(6):791-803.
- Mylona P, Kielty CM, Hoyland JA, Aplin JD. 1995. Expression of type VI collagen mRNAs in human endometrium during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. *J Reprod Fertil*, 103:159-167.
- Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Young G, Shortkroff S, Louie LK, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. 1997. Matrix collagen type and pore size influence behavior of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials*, 18:769-776.
- Nehrer S, Spector M, Minas T. 1999. Histologic Analysis of Tissue After Failed Cartilage Repair Procedures. *Clin Orthop Relat Res*, 365:149-162.
- Obradovic B, Martin I, Padera RF, Treppo S, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 2001. Integration of engineered cartilage. *J Orthop Res*, 19(6):1089-1097.
- Ochi M, Uchio Y, Tobia M, Kuriwaka M. 2001. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artif Organs*, 25:172-179.
- Pauwels F. 1960. Eine neue Theorie über den Einfluß mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 121:478-515.
- Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. 2002. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med*, 30(1):2-12.
- Peterson L MT, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. 2000. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res*, (374):212-234.



- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. 2001. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. Clin Orthop Relat Res, (Suppl 391):S26-33.
- Poole CA. 1997. Articular cartilage: form, function and failure. J Anat, 191:1-13.
- Poole CA, Ayad S, Gilbert RT. 1992. Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. J Cell Sci, 103 ( Pt 4):1101-1110.
- Prakash D, Learmonth D. 2002. Natural progressing of osteochondral defect in the femoral condyle. Knee, 9:7-10.
- Pridie KW. 1959. A method of resurfacing osteoarthritis knee joint. J Bone Joint Surg Br, 41-B:618-619.
- Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP. 1994. Tissue engineered growth of cartilage: effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. Int J Oral Maxillofac Surg, 23:49-53.
- Pullig O, Weseloh G., Swoboda B. 1999. Expression of type VI collagen in normal and osteoarthritic human cartilage. Osteoarthritis cartilage, 7:191-202.
- Quarto R, Dozin B, Bonaldo P, Cancedda R, Colombatti A. 1993. Type VI collagen expression is upregulated in the early events of chondrocyte differentiation. Development, 117(1):245-251.
- Reddi A. 1998. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. Nat Biotechnol, 16:247-252.

- Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Roberts S. 1999. Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br*, 81(6):1064-1068.
- Roberts S, Hollander AP, Caterson B, Menage J, Richardson JB. 2001. Matrix turnover in human cartilage repair tissue in autologous chondrocyte implantation. *Arthritis Rheum*, 44(11):2586-2598.
- Rodan GA. 1992. Introductio to bony biology. *Bone*, (13)Suppl:S3-S6.
- Rodriguez AM, Vacanati CA. 1998. Tissue engineering of cartilage. In: Patrick Jr CW, Mikos AG, McIntire LV., Hrsg. *Frontiers in tissue engineering*. Aufl. New York: Elsevier Science, 400-411.
- Romeis. 1989. Nachweis organischer Substanzen. In: Böck P, Hrsg. *Mikroskopische Tech-nik*. 2te Aufl. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 443.
- Roughley PJ, Lee ER. 1994. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech*, 28(5):385-397.
- Sailor LZ, Hewick RM, Morris EA. 1996. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture. *J Orthop Res*, 14(6):937-945.
- Schaefer D, Martin I, Jundt G, Seidel J, Heberer M, Grodzinsky A, Bergin I, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. 2002. Tissue-engineered composites for the repair of large osteochondral defects. *Arthritis Rheum*, 46(9):2542-2534.
- Schaefer D, Martin I, Shastri P, Padera RF, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 2000. In vitro generation of osteochondral composites. *Biomaterials*, 21(24):2599-2606.

- Schmid T.M., Linsenmayer T.F. 1990. Immunelectronic microscopy of type X collagen: supramolecular forms within embryonic chick cartilage. *Dev Biol*, 138:53-62.
- Schulze-Tanzil G dSP, Villegas Castrejon H, John T, Merker HJ, Scheid A, Shakibaei M. 2002. Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res*, 308(3):371-379.
- Schwartz ER, Kirkpatrick PR, Thompson RC. 1974. Sulfate metabolism in human chondrocyte cultures. *J Clin Invest*, 54:1056-1063.
- Sellers RS, Zhang R, Glasson SS, Kim HD, Peluso D, D'Augusta DA, Beckwith K, Morris EA. 2000. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am*, 82(2):151-160.
- Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. 1993. Cell origin and differentiation in the repair of full thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 75:532-553.
- Sherwin AF, Carter DH, Poole CA, Hoyland JA, Ayad S. 1999. The distribution of type VI collagen in the developing tissues of the bovine femoral head. *Histochem J*, 31(9):623-632.
- Sittinger M, Perka C, Schultz O, Haupl T, Burmester GR. 1999. Joint cartilage regeneration by tissue engineering. *Z Rheumatol*, 58(3):130-135.
- Steadmann JR, Rodrigo JJ, Briggs KK, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. 2003. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-years follow-up. *Arthroscopy*, 19:477-484.
- Stevens A, Lowe J. 1997. Die Zelle- Zelltod. In: Alan Stevens, James Lowe, Hrsg. *Histologie des Menschen*. 2te Aufl. London, Glsagow, Weinheim, New York, Tokio Melbourne Madras: Chapman and Hall, 30-31.

- Stewart MC, Saunders KM, Burton-Wurster N, Macleod JN. 2000. Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *J Bone Miner Res*, 15(1):166-174.
- Tew S, Kwan APL, Hann A, Thomson B, Archer CW. 2000. The reaction of articular to experimental wounding: role of apoptosis. *Arthritis Rheum*, 43:215-225.
- Tew S, Li Y, Tweats LM, Katopodi T, Hawkins RE, Hardingham TE. 2003. SOX9 transduction and TGF-beta-3 treatment of late passage human articular chondrocytes in pellet culture potentiates cartilage matrix formation. *European Cells and Materials*, 2003 (6 Suppl 2):53.
- Tognana E, Padera RF, Chen F, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. 2005. Development and remodeling of engineered cartilage-explant composites in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage*, 13(10):896-905.
- Triantofillipopoulos IK, Papagelopoulos PJ, Politi PK, Nikiforidis PA. 2002. Articular changes in experimentally induced patellar trauma. *Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 10:144-153.
- Twayman RS, Desai K, Aichorth PM. 1991. Osteochondrosis dissecans of the knee: A long term study. *J Bone Joint Surg Br*, 73:461.
- Tyler JA. 1985. Chondrocyte mediated depletion of articular cartilage proteoglycans in vitro. *Biochem J*, 260:493-507.
- Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R, O'Keefe RJ. 2003. Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Surg*, 11(6):421-430.
- Winter GM, Poole CA, Ilic MZ, Ross JM, Robinson HC, Handley CJ. 1998. Identification of distinct metabolic pools of aggrecan and their relationship to type VI collagen in the chondrons of mature bovine articular cartilage explants. *Connect Tissue Res*, 37(3-4):277-293.

- Wirth CJ, Rudert M. 1996. Techniques of cartilage growth enhancement: a review of the literature. *Arthroscopy*, 12:300-308.
- Woodfield TB, Bezemer JM, Pieper JS, van Blitterswijk CA, Riesle J. 2002. Scaffolds for tissue engineering of cartilage. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 12(3):209-236.
- Zaleskas JM, Kinner B, Freyman TM, Yannas IV, Gibson LJ, Spector M. 2004. Contractile forces generated by articular chondrocytes in collagen-glycosaminoglycan matrices. *Biomaterials*, 25(7-8):1299-1308.
- Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RG, Francomano CA. 2005. Growth and integration of neocartilage with native cartilage in vitro. *J Orthop Res*, 23(2):433-439.
- Zheng, King E, Kirilak Y, Papadimitriou JM, Wood DJ, Xu J. 2004. Molecular characterisation of chondrocytes in autologous chondrocyte implantation. *Int J Molec Med*, 13:623-628.

## Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abb 1 Schematischer Aufbau des hyalinen Knorpels. Quelle: Cover, Chemical& Engineering News, March 13, 1995	4
Abb 2 Schematischer Aufbau der Extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpels. In das Netz der Kollagene sind die Proteoglykane eingelagert, deren wichtigster Vertreter das Aggrekan ist. Quelle: <a href="http://www.cdaarthritis.com">http://www.cdaarthritis.com</a>	4
Abb 3 Schematische Darstellung der ACT nach Brittberg et al. (1994)	9
Abb 4 Beispiel für die Durchführung mittels Arthrotomie nach Brittberg et al.:	9
1+2 Präparation des Knorpeldefekts	9
3. Aufgenähter Periostlappen	9
4. Läsion 12 Monate postoperativ	9
Abb 5 Verlust der basophilen Anfärbbarkeit der Zellkerne im Bereich des Defektrandes (rechts) im Vergleich zu Arealen (links), die weiter entfernt liegen, aus einem Versuchsansatz, in dessen Knorpeldefekt eines Knorpel-Knochen-Explantats eine Zellsuspension eingebracht und die Oberseite mit einer Kollagenmembran überdeckt wurde. Diese Tatsache zeugt vom Zelltod in den Defekträndern und könnte eine Erklärung für das mangelhafte Einwachsverhalten von Implantaten sein. Versuchsansatz der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Links Übersichtsbild HE 1,25x, Rechts Fotografie des Defektrandes HE 10x	11
Abb 6 Schrumpfung eines Kollagengels in der Zellkultur, während eines Zeitraums von 3 Wochen.	13
Abb 7 Abbildungen, welche die Variabilität der Form des Spongostans® deutlich machen. Quelle: Johnson& Johnson™	18
Abb 8 Spongiöse Struktur des Spongostans®	18

Abb 9 Linkes, bovines Kniegelenk, aus Nickel R, Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, 1992	25
Abb 10 Eröffnetes bovines Kniegelenk	25
Abb 11 Femurkondylen nach der Ernte der Knorpel-Knochen-Explantate	25
Abb. 12 Darstellung der Herstellung des 3D-In-vitro-Modells	27
a) Knorpel-Knochen-Explantat	27
b) Ausstanzen der Löcher	27
c) Mischen des Implantats	27
d) Einpflanzen des Implantats; plastiline Masse an der Vorderseite des Metallstabes.	27
e) Implantat im Defekt	27
f) Fertiges Modell in der Zellkultur	27
Abb 13 Schema des 3D-in-vitro-Kulturmodells	29
Abb. 15 Messprinzip der Real-Time-PCR. Messung im ansteigenden Teil der Fluoreszenzkurve nachdem ein Schwellenwert überschritten wurde.	36
Abb. 16 Wirkungsprinzip des SyberGreens®, das an doppelsträngige DNA gebunden fluoresziert.	36
Abb. 17 Beispiel für Schmelzkurvenanalyse (Koll VI Monolayer vs. kultiviertes Knorpel-Knochen-Stück): Der peak bei 75°C wird von Primerdimeren erzeugt(Koll VI Monolayer), d.h. hier ist kein PCR-Produkt enthalten. Bei 93°C resultiert der peak vom PCR-Produkt.	37
Abb. 18 Verwachsenes Spongotanimplantat mit der Kollagenmembran. Zu beachten, oben im Bild die gewellten kollagenen Fasern der ChondroGide®-Membran, darunter die fluoreszierenden Zellkerne aus dem Implantat, die teilweise auch schon zwischen den Kollagenfasern der Membran nachweisbar sind, Prodigiumjodidfärbung, 20x	40
Abb. 19 Lückenlos gefüllte Stanzlöcher nach Kultur.	40
Abb. 20 Spongostanimplantate nach dem Herausstanzen.	40
Abb. 21 Ausgestanzter Knorpel-Knochen-Zylinder	40

Abb. 22: Semidünnschnitt nach „Richardson“, Zu beachten, die enge Verbindung zwischen Implantat und Knorpel, 40x	41
Abb. 23: Unabhängige Ausrichtung der Kollagenfasern des Randknorpels (rechte Bildhälfte) vor Kultivation, EM 11500x	41
Abb. 24: EM Übersichtsdarstellung. Orientierung der Kollagenfaser in Richtung Implantat, 6000x	41
Abb. 25 Höhere Vergrößerung als Abb 24. Zu beachten, die Orientierung der Kollagenfasern in Richtung des Implantats und die Verbindung mit dem Implantat, a 11500x, b 39000x	41
Abb. 26 Zellverteilung im frischen Knorpel an der Oberfläche, DAPI, 10x	42
Abb. 27 Zellverteilung in der mittleren Zone des frischen Knorpels, DAPI, 10x	42
Abb. 28 Zellverteilung im Spongostanimplantat nach 3 Wochen Kultur, DAPI, 20x	42
Abb. 29 Relative Zellverarmung, im Vergleich zu (Abb. 27), in der mittleren Zone des Knorpels des Knorpel-Knochen-Stücks nach Kultur, DAPI, 10x	43
Abb. 30 Clusterbildung über dem subchondralen Knochen nach 3 Wochen Kultur, DAPI, 10x	43
Abb. 31 Chondrozyt im Spongostan®. Zu beachten, Umgebung des Chondrozyten aus Kollagen, EM 5500x	44
Abb. 32 Detailaufnahme der Spongostan®-Chondrongrenze, EM 15 500x	44
Abb. 33 Perizellulär abgegebene Matrixvesikeln eines Chondrozyten im Spongostan®, lassen auf Vitalität und Stoffwechselaktivität der Zelle schließen, EM 39 000x	44
Abb. 34 Zellausschnitt eines Chondrozyten im Spongostan®. Zu sehen, aktiver Stofftransportprozess über die Zellkernmembran, EM 15500x	44
Abb. 35 Detailaufnahme aus Abb. 33, Transportprozess über die Zellkernmembran, Raues endoplasmatisches Retikulum um den Zellkern, EM 39000x	44
Abb. 36 Übersichtsaufnahme aus einem Spongostan-implantat. Entlang des spongiösen Maschenwerks ist die beginnende Organisation der Chondrozyten gut erkennbar. Auch die homogene Zellverteilung wird deutlich, H&E, 10x.	45



Abb. 37 Detailaufnahme aus einem Spongostanimplantat (aus Abb. 36). Die Zellen präsentieren deutlich eine chondroide Morphologie, H&E, 40x.	45
Abb. 38 MR-Aufnahme, 40x Dedifferenzierte Chondrozyten aus den Monolayerkulturen. Zu erkennen sind die lang gestreckten Zellkerne und die filiformen Ausziehungen der Zellen.	45
Abb. 39 MR-Aufnahme, 40x. Detailaufnahme aus dem Spongostanimplantat: Vergleich des chondroiden Habitus zu dem der dedifferenzierten Chondrozyten des nebenstehenden Bildes.	45
Abb. 40 Verhältnis der Kollagen I zu Kollagen II mRNA-Expression	46
Abb. 41 SOX-9-Expression in frischem hyalinem Knorpel. Zu beachten die typische paarweise Anordnung der Chondrozyten, SOX-9 kam hier v.a. intranukleär zur Darstellung, Immunhistologie, 20x	47
Abb. 42: SOX-9-Expression in einem Knorpel-Knochen-Explantat. Zu beachten, der Verlust der Anordnung zu Paaren, SOX-9 war v.a. intranukleär lokalisiert, Immunhistologie, 20x	47
Abb. 43: SOX-9-Expression der Chondrozyten im Spongostan®, im Hintergrund die Autofluoreszenz des Spongostans® 40x	47
Abb. 44: Darstellung der vorwiegend intranukleären Lage (roter Pfeil) und teilweisen extranukleären Lage (gelber Pfeil) des SOX-9 durch zusätzliche Darstellung der Zellkerne mit der DAPI-Färbung, Immunhistologie, 40x	47
Abb. 45: mRNA-Expression des SOX-9	48
Abb. 46 Qualitatives mRNA-Profil boviner Chondrozyten nach Kultivation im Spongostan-in-vitro-Modell	49
Abb. 47: Aggrekandeposition in den Knorpel-Knochen-Explantaten, Immunhistologie, 20x	50
Abb. 48: Aggrekandeposition im Spongostan®, Immunhistologie, 20x	50
Abb. 49: Aggrekandeposition im Vergleich zur Lage der Zellen im Spongostan®, Immunhistologie, 20x	50

Abb. 50: Aggrekandeposition in der Umgebung von Zellen, die aus dem Monolayer gewonnen wurden Immunhistologie, 40x	51
Abb 51.: Der Nachweis der Aggrekandeposition gelang bei den Monolayerzellkulturen insbesondere an Stellen, wo die Zellen dicht gepackt beieinander lagen. Vergleiche Bildmitte mit den äußeren Bereichen. 40x	51
Abb. 52 Aggrekan-mRNA-Expression	52
Abb. 53 Knorpel-Knochen-Explantat, Alcianblau, 20x	52
Abb. 54: Übergangsbereich des Implantats zum Knorpel. Intensiv gefärbter Übergangsbereich Randknorpel/Implantat, Alcianblau, 20x	52
Abb. 55: Detailaufnahmen aus dem Randbereich zwischen Implantat und Knorpel, Alcianblau, 100x	53
Abb. 56: Ubiquitäre Verteilung des Kollagen-Typs II in frischem Knorpel, Immunhistologie, 10x	53
Abb. 57: Auch im Knorpel der Knorpel-Knochen-Explantaten war Kollagen-Typ II noch ubiquitär nachweisbar, jedoch bevorzugt an der Oberfläche. Immunhistologie, 20x	53
Abb. 58: Kollagen-Typ-II-Expression aus dem Inneren eines Spongostanimplantats. Zu beachten, im Hintergrund die Autofluoreszenz des Spongostans (Pfeil), 20x	54
Abb. 59: Kollagen-Typ-II-Deposition im Vergleich zur zellulären Lage der Chondrozyten, Immunhistologie, 20x	54
Abb. 60: Im Monolayer scheinen nicht alle Zellen Kollagen-Typ II zu exprimieren (Pfeil weist auf positiven Bereich). Zu beachten, dass dies am ehesten Zellen aus dicht gepackten Zellbezirken sind. Immunhistologie, 20x	54
Abb. 61: Kollagen-Typ-II-Expression im Vergleich zur zellulären Lage, Immunhistologie, 20x	54
Abb. 62 mRNA-Expressionsniveau des Kollagens-Typ-II	55
Abb. 63: Lokalisation des Kollagens-Typ VI in frischem hyalinem Knorpel. Jedem der Kollagen VI positiv dargestellten Chondrone können auch ein bis teilweise drei Zellkerne zugewiesen werden, 10x	56

Abb. 64: Kollagen-Typ-VI-Deposition in der Superfizialschicht der Knorpel-Knochen-Explantate, Immunhistologie, 20x	56
Abb. 65: Kollagen-Typ-VI-Deposition über dem subchondralen Knochen. Zu beachten, die Clusterbildung der Zellen zum einen und die häufig leeren Chondrone in den höheren Zellschichten zum anderen, Immunhistologie, 10x	56
Abb. 66: Kollagen-Typ-VI-Deposition im Spongostan, Immunhistologie, 20x	57
Abb. 67: Lokalisation des Kollagen-Typs VI in Bezug auf die zelluläre Lage. Zu beachten ist, wie sich das Kollagen-Typ VI um die Zellen herum lagert. Immunhistologie, 20x	57
Abb. 68: Kollagen-Typ-VI-Expression im Monolayer. Die Kollagen-Typ VI wird nur spärlich und dann im Bereich von Zellzusammenlagerung expremiert. Immunhistologie, 20x	57
Abb. 70: Kollagen-Typ-X-Expression innerhalb des Spongostans, Immunhisologie 20x	58
Abb. 71: Kollagen-Typ-X-Expression innerhalb der Monolayerkultur, Immunhisologie, 20x	58
Abb 72 mRNA-Expressionsniveau Kollagen-Typ X	59
Abb. 73: Schmäler Kollagen-I-Saum an der Knorpeloberfläche des frischen Knorpels, Immunhistologie, 10x.	60
Abb. 74: Zunahme der Kollagen I Expression in den Knorpel-Knochen-Explantaten insbesondere in den superfiziellen Zelllagen, Immunhistologie, 10x.	60
Abb. 75: Kollagen-Typ-I-Expression im Spongostanimplantat, Immunhistologie, 20x	60
Abb. 76: Kollagen-Typ-I-Expression in der Monolayerzellkultur, Immunhistologie, 20x	60
Abb. 77 mRNA-Expressionsniveau des Kollagen-Typs I	61
Abb. 78: Kollagen-Typ-III-Expression im Spongostanimplantat, Immunhistologie, 20x	61

Abb. 79: Kollagen-Typ-III-Expression in der Monolayerzellkultur, Immunhistologie, 20x	61
Abb. 80: mRNA-Expressionsniveau des Kollagens III	62

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R.A. Venbrocks, Direktor des Waldkrankenhauses Rudolf-Elle, Klinik für Orthopädie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, danke ich für die Überlassung des Themas als Dissertation. Außerdem bedanke ich mich für die Möglichkeit der umfangreichen Nutzung von Ressourcen des Waldkrankenhauses Rudolf-Elle in Eisenberg.

Herrn Dr. rer. nat. J. Mollenhauer und Herrn Dr. med. J. Anders sage ich Dank für die Betreuung, Unterstützung und das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Ebenfalls danke ich allen Mitarbeitern des Forschungslabors des Waldkrankenhauses Rudolf-Elle für ihre stetige und großzügige Hilfe.

Außerdem möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während der Erstellung dieser Arbeit beigestanden haben.

Lebenslauf

15.08.1979	Nils Kröger geb. in Blankenburg/Harz ledig
1986-1992	POS und Sekundarschule „Dr. Hermann Blumenau“ in Hasselfelde
1992-1998	Gymnasium „Hochharz“ in Elbingerode
1998, Juli	Abitur
1998-2001	Niedersächsische Fachhochschule für Verwaltung und Rechtspflege in Hildesheim
2001, Oktober	Diplom Rechtspfleger (FH)
2001- 2007	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2007, Oktober	Medizinisches Staatsexamen
2007, Dezember	Promotion

Jena im Dezember 2007

Nils Kröger

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Dr. med. J. Anders,

Dr. rer. nat. J. Mollenhauer

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,

Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 12.02. 2007

Nils Kröger, Verfasser